










DEMANDE DE BREVET EUROPEEN


 Numéro de dépôt: 88402741.8


 Int. Cl.⁴: **C 07 C 101/28**
C 07 K 5/06, C 07 C 103/50,
A 61 K 31/16, A 61 K 31/195


 Date de dépôt: 02.11.88


 Priorité: 03.11.87 FR 8715209

 Date de publication de la demande:
 10.05.89 Bulletin 89/19

 Etats contractants désignés:
 AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE


 Demandeur: ROUSSEL-UCLAF
 35, boulevard des Invalides
 F-75007 Paris (FR)


 Inventeur: Agouridas, Constantin
 67, Quai d'Orsay
 F-75007 Paris (FR)


Fauveau, Patrick
 40, Avenue Camille Desmoulins
 F-93190 Livry-Gargan (FR)

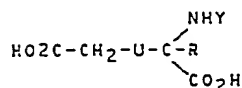
Damais, Chantal
 24-26, rue du Cotentin
 F-75015 Paris (FR)


 Mandataire: Tonnellier, Marie-José et al
 111, route de Noisy B.P. no 9
 F-93230 Romainville (FR)

Une requête en rectification de la description a été présentée conformément à la règle 88 CBE. Il est statué sur cette requête au cours de la procédure engagée devant la division d'examen (Directives relatives à l'examen pratiqué à l'OEB, A-V, 2.2).


 Nouveaux dérivés de l'acide aminopimélique, leur procédé de préparation et leur application comme médicaments.


 L'invention a pour objet les composés de formule (I) :



(I)

liaison ainsi que leurs esters avec les alcools, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

Les composés de formule (I) présentent d'intéressantes propriétés thérapeutiques qui justifient leur utilisation comme médicaments.

dans laquelle U représente un radical $\text{CH}=\underset{\text{a}}{\overset{\text{I}}{\text{C}}}\text{H}=\text{CH}-$ dans

lequel les traits pointillés représentent une seule double liaison éventuelle de configuration cis ou trans et a représente un atome d'hydrogène, un radical méthyle ou un groupement méthylène $-\text{CH}_2-$, Y représente un atome d'hydrogène ou le reste d'un acide aminé lié par le carboxyle alpha ou oméga ou d'un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont l'amine est éventuellement acylée par un acide aliphatique ou alkylée et R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle éventuellement substitué à la condition que si Y représente un atome d'hydrogène, un radical alanine ou proline et si a représente un atome d'hydrogène, U renferme une double

Description

Nouveaux dérivés de l'acide aminopimélique, leur procédé de préparation et leur application comme médicaments

La présente invention concerne des dérivés de l'acide aminopimélique, leur procédé de préparation et leur application comme médicaments.

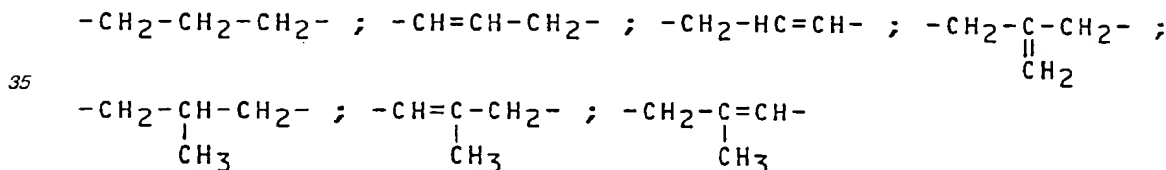
L'invention a pour objet les composés de formule (I) :



dans laquelle U représente un radical $\text{CH}=\underset{\text{I}}{\underset{\text{a}}{\text{CH}}}-\text{CH}=\text{CH}-$

dans lequel les traits pointillés représentent une seule double liaison éventuelle de configuration cis ou trans et a représente un atome d'hydrogène, un radical méthyle ou un groupement méthylène $-\text{CH}_2-$, Y représente un atome d'hydrogène ou le reste d'une acide aminé lié par le carboxyle alpha ou oméga ou d'un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont l'amine est éventuellement acylée par un acide aliphatique saturé ou insaturé refermant de 6 à 24 atomes de carbone ou alkylée par un radical alkyle renfermant de 1 à 8 atomes de carbone et R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, refermant jusqu'à 8 atomes de carbone éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, à la condition que si Y représente un atome d'hydrogène, un radical alanine ou proline et si a représente un atome d'hydrogène, U renferme une double liaison ainsi que leurs esters avec les alcools refermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

U représente un radical :



Lorsque R représente un radical alkyle, il s'agit de préférence du radical méthyle, éthyle, propyle, isopropyle ou butyle ou d'un radical insaturé comme le radical vinyle, allyle, éthylnyle ou propynyle.

Lorsque R représente un radical alkyle substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, il s'agit de préférence d'un radical alkyle substitué par un ou plusieurs atomes de fluor ou de chlore, par exemple, les radicaux $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CHCl}_2$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$.

Dans la formule générale I et dans ce qui suit, l'acide aminé est de préférence un acide alpha-aminé et peut être choisi dans le groupe constitué par Ala, Val, Ival, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Thr, Cys, Met, Lys, Arg, Phe, Tyr, Trp, His et Pro, Nva, Nle, Hyp, Orn, ces acides étant sous la forme D ou L ainsi que par Sar et Gly, tous les acides précédemment nommés pouvant être N acylés ou N-alkylés dans le cas d'un peptide comprenant 2, 3 ou 4 acides aminés, ceux-ci sont choisis dans le groupe constitué par les acides aminés ci-dessus.

On admettra par convention que les symboles des acides alpha-amino carboxyliques représentent ces acides sous leur configuration D ou L (par exemple, le terme Ala signifie Alanine sous forme D ou sous forme L).

L'acide aliphatique saturé ou insaturé renferme de 6 à 24 atomes de carbone et de préférence de 12 à 22 atomes de carbone ; on peut citer par exemple les acides stéarique, palmitique, laurique, caprylique, myristique, alpha ou gamma linoléique, linoléique, arachidonique ou docosopentaénoïque.

Les sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques peuvent être, par exemple, les sels formés avec les acides chlorhydrique, bromhydrique, nitrique, sulfurique, phosphorique, acétique, formique, propionique, benzoïque, maléïque, fumarique, succinique, tartrique, citrique, oxalique, glyoxylique, aspartique, alcanesulfoniques tels que les acides méthane ou éthanesulfoniques, arylsulfoniques, tels que les acides benzène ou paratoluènesulfoniques et arylcarboxyliques.

Les sels des dérivés de l'invention peuvent être formés avec des bases organiques et minérales. Parmi les

bases minérales, ou peut citer les hydroxydes alcalins et alcalinoterreux, tels que par exemple, les hydroxydes de sodium, de potassium, de lithium et de calcium, l'hydroxyde de magnésium ou d'ammonium. Parmi les bases organiques, on peut citer les amines alkylées substituées ou non substituées, telles que par exemple, la triméthylamine, la méthylamine, la propylamine, la N,N-diméthyléthanolamine ou la tris(hydroxyméthyl)méthylamine ; on peut citer également des acides aminés basiques tels que, par exemple, la lysine ou l'arginine ; on peut citer encore d'autres bases telles que, par exemple, la glucosamine ou la procaine.

Parmi les composés préférés de l'invention, on peut citer les composés de formule (I) dans lesquels U représente un radical :



ou un radical : $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$

ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases. On peut également citer comme composés préférés, les composés dans lesquels Y est choisi dans le groupe des restes de l'alanine, la proline, la lysine et l'acide alpha ou gamma glutamique et tout spécialement les composés dans lesquels Y représente le reste de l'alanine ainsi que ceux dans lesquels Y représente le reste de la lysine.

L'invention a tout particulièrement pour objet les composés de formule (I), dans lesquels R représente un atome d'hydrogène ou encore ceux dans lesquels R représente un radical méthyle ou dans lesquels R représente un radical $-\text{CHF}_2$, ou encore éthyne ou vinyle.

Parmi les composés préférés de l'invention, on peut citer les produits dont la préparation est donnée ci-après dans la partie expérimentale et tout particulièrement les produits des exemples 6, 9, 13, 15 et 16. Les amides sont de préférence des amides du type primaire RCONH_2 ou secondaire RCONHAlc , alc représentant un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone comme, par exemple, un radical méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle.

Les dérivés, objet de la présente invention, possèdent de très intéressantes propriétés pharmacologiques, ils sont doués notamment de remarquables propriétés immunomodulatrices, notamment par activation des monocytes humaines et production de monokines telles le TNF (Tumor Necrosis factor) et l'IL1 (Interleukine 1) seuls ou en présence de l'IFN gamma ainsi que d'intéressantes propriétés anti-bactériennes.

Ces propriétés sont illustrées plus loin dans la partie expérimentale.

Ces propriétés justifient l'utilisation des produits de l'invention ainsi que de leurs sels, à titre de médicaments.

La présente demande a ainsi également pour objet l'application, à titre de médicaments, des dérivés de formule (I) ainsi que de leurs sels d'addition pharmaceutiquement acceptables.

Les médicaments selon l'invention trouvent leur emploi, par exemple, dans le traitement des maladies auto-immunes, qu'il s'agisse d'atteintes non spécifiques d'organes (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux, anémie hémolytique, leucopénie auto-immune etc...) ou qu'il s'agisse de maladies spécifiques d'organes (thyroïdite, maladie de Basedow, d'Addison, sclérose en plaques, pemphigus, rectocolite hémorragique, certaines néphropathies, etc...). Ces médicaments peuvent également être utilisés dans le traitement des hémopathies, du cancer, du sida, des affections virales et microbiennes, surtout chroniques et récurrentes (bronchite, grippe etc...) ; des maladies des cavités buccales, etc.. Ils peuvent constituer des adjuvants de la thérapie antivirale, de l'antibiothérapie vis-à-vis des germes bactériens et les levures, les champignons (*Candida albicans*...) ou de la chimiothérapie anticancéreuse.

Il trouve également leur application dans le traitement de nombreux déficits immunitaires secondaires ou acquis observés au cours d'affections très diverses : déficits associés aux troubles métaboliques, déficits d'origine iatrogène, (corticoïdes, radiations ionisantes...) déficits observés chez les grands brûlés, etc.

La dose usuelle, variable selon le dérivé utilisé, le sujet et l'affection en cause peut être par exemple de 0,05 mg à 50 mg par jour. Par voie orale, chez l'homme, le dérivé de l'exemple 8 peut être administré à la dose quotidienne de 0,5 mg à 50 mg, par exemple pour la prévention ou le traitement des infections bactériennes, virales ou fongiques ainsi que pour le traitement des tumeurs d'origine diverses.

Les médicaments selon l'invention trouvent également leur emploi comme antibiotiques dans le traitement des affections bactériennes.

Parmi les médicaments préférés de l'invention, on peut citer ceux qui renferment comme principe actif, les produits des exemples 6, 9, 13, 15 et 16.

Par ailleurs, on a également constaté que l'on obtenait des résultats particulièrement intéressants en associant les produits de formule (I) et l'interféron gamma pour la production par les monocytes de monokines du type TNF, IL₁ par exemple.

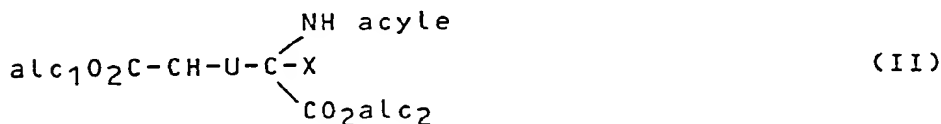
L'invention a enfin pour objet les compositions pharmaceutiques qui renferment au moins un dérivé précité ou l'un de ses sels d'addition avec les acides pharmaceutiquement acceptables, à titre de principe actif.

A titre de médicaments, les dérivés répondant à la formule (I) et leurs sels d'addition avec les acides ou les bases pharmaceutiquement acceptables peuvent être incorporés dans des compositions pharmaceutiques destinées à la voie digestive ou parentérale.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être, par exemple, solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine, comme, par exemple, les comprimés,

simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les suppositoires, les préparations injectables, elles sont préparées selon les méthodes usuelles. Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

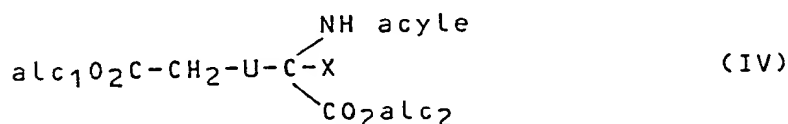
L'invention a également pour objet un procédé de préparation des composés de formule (I), caractérisé en ce que l'on soumet un composé de formule (II) :



dans laquelle U conserve sa signification précédente, alc₁ et alc₂, identiques ou différents, représentent un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, X représente soit le radical R, soit un groupement -CO₂alc₃ dans lequel alc₃ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone et acyle représente le reste d'un acide organique renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone à l'action d'un halogénure d'alcanesulfonyle ou d'arènesulfonyle de formule (III) :



dans lequel alc₄ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone ou un radical aryle renfermant jusqu'à 14 atomes de carbone, puis à l'action d'un agent de réduction pour obtenir le composé de formule (IV) :



que l'on soumet, si désiré, à la totalité ou à une partie seulement des opérations suivantes dans un ordre quelconque :

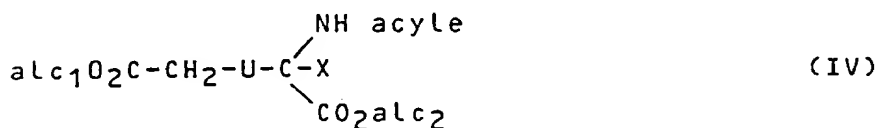
- a) déprotection de la fonction amine,
- b) hydrolyse des fonctions esters, puis le cas échéant décarboxylation lorsque X représente un radical -CO₂alc₃,
- c) réduction de la double liaison,
- d) estérification ou salification par une base des fonctions carboxy,
- e) salification des fonctions amino par un acide,
- f) amidification des fonctions aminées libres par un acide aminé ou un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont la fonction aminée est protégée puis déprotection de cette fonction aminée.

Dans un mode de réalisation préférée du procédé de l'invention :

- l'halogénure d'alcanesulfonyle ou d'arènesulfonyle est le chlorure de méthanesulfonyle utilisé en présence d'un agent de condensation comme la pyridine ou dans un solvant neutre comme le chlorure de méthylène en présence d'une base comme la triéthylamine,
 - l'agent de réduction peut être un métal comme le zinc en présence d'iodure de sodium, dans un solvant basique,
 - la déprotection de la fonction amine est réalisée de préférence par action d'un acide minéral dilué tel que l'acide chlorhydrique ou d'un acide organique tel que l'acide trifluoroacétique dans l'alcool benzylique en présence d'un agent tel que le chlorure d'acétyle,
 - l'hydrolyse des fonctions esters est réalisée de préférence par saponification à l'aide d'une base minérale comme la soude ou la potasse suivie le cas échéant, d'un traitement par une résine acide.
- Lorsque X représente un groupement -CO₂alc₃, l'hydrolyse de la fonction ester est suivie d'une décarboxylation réalisée de préférence à l'aide d'un acide organique tel que l'acide acétique ; elle peut également être effectuée à l'aide d'un acide minéral tel que l'acide chlorhydrique 12N et chauffage dans un solvant tel que l'éthanol. Elle peut également intervenir lors du traitement par la résine acide. Une décarboxylation directe peut aussi être réalisée par la procédure de Krapcho ou celle de Keinan et Eren (J. Org. Chem 51 3165-3169 (1986)).
- l'amidification est réalisée en présence d'agents de condensation comme le dicyclohexylcarbodiimide, le

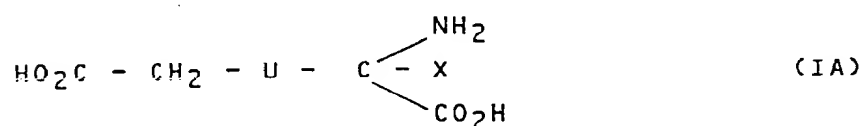
N,N'-carbonyl diimidazole ou des amides bis-alkyliques d'acides sulfurés tels que le N,N'-sulfinyl-bis(diméthylamine), $\text{SO}(\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2$, ou encore par formation d'anhydride mixte avec le chloroformiate d'isobutyle.

L'invention a plus précisément pour objet un procédé caractérisé en ce que l'on effectue sur le dérivé de formule :



dans laquelle alc_1 , alc_2 , acyle et X sont définis comme précédemment, les opérations suivantes et dans cet ordre :

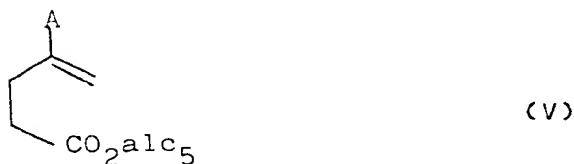
- déprotection de la fonction aminée,
- hydrolyse des fonctions esters, pour obtenir le composé de formule (IA) :



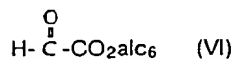
dans laquelle X' représente soit le radical R soit un groupement $-\text{CO}_2\text{H}$, produit (IA) que, si désiré, l'on amidifie par un acide aminé ou un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont la fonction aminée est protégée, soumet, le cas échéant à une décarboxylation la fonction X', puis déprotège la fonction aminée du produit obtenu que l'on réduit, si désiré.

Les différentes étapes de ce procédé sont réalisées selon les modes de réalisation préférés décrits ci-dessus.

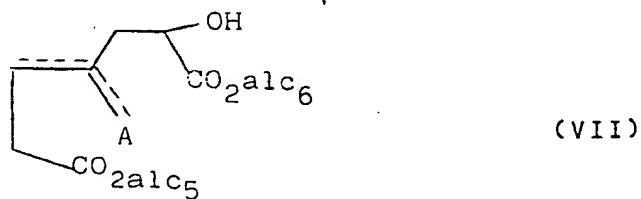
L'invention a également pour objet une variante du procédé précédent, caractérisée en ce que l'on soumet le composé de formule :



dans laquelle alc_5 représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone et A représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle, à l'action d'un composé de formule (VI) :



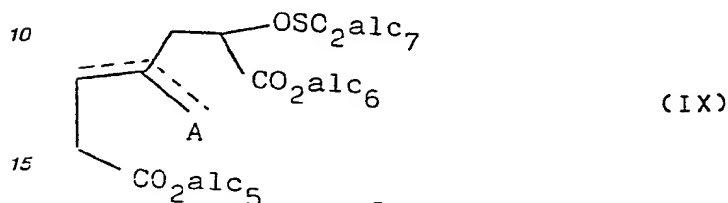
dans laquelle alc_6 représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, pour obtenir le composé de formule (VII) :



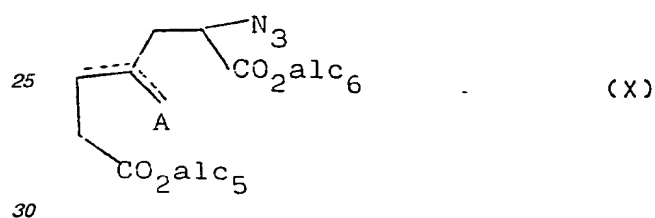
que l'on soumet à l'action d'un halogénure d'alcanesulfonyle ou d'arènesulfonyle de formule (VIII) :



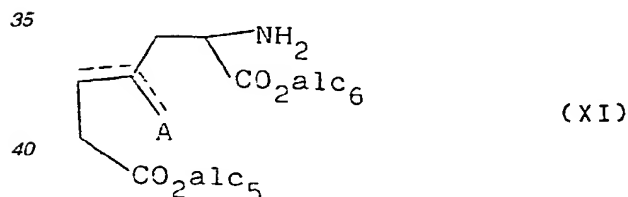
- 5 dans lequel alc_7 représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 3 atomes ou un radical aryle renfermant jusqu'à 14 atomes de carbone, pour obtenir le composé de formule (IX) :



- 20 que l'on soumet, à l'action d'un azoture alcalin, pour obtenir le composé de formule (X) :



que l'on réduit et soumet le produit ainsi obtenu à une hydrolyse aqueuse, pour obtenir le composé de formule (XI) :



- 45 que l'on soumet, si désiré, à la totalité ou à seulement une partie des opérations suivantes dans un ordre quelconque :

- 50 a) hydrolyse des fonctions ester,
b) amidification des fonctions amino libres par un acide aminé ou un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont la fonction amino est protégée puis déprotection de cette fonction amino,
c) réduction de la double liaison,
d) estérification ou salification par une base des fonctions carboxy,
e) salification par un acide des fonctions amino.

Dans un mode de réalisation préférée :

- 55 - la condensation des composés (V) et (VI) a lieu en présence de chlorure ferrique ou de tétrachlorure de titane ou de tout autre acide de Lewis connu ;
- l'halogénure d'alcanesulfonyle ou d'arènesulfonyle est le chlorure de méthanesulfonyle utilisé en présence d'un agent de condensation telle que la pyridine ou d'un solvant neutre comme le chlorure de méthylène en présence d'une base comme la triéthylamine ;
- l'azoture alcalin est l'azoture de sodium ; on peut également utiliser le diphényl phosphorylazide (pour le passage direct de l'alcool à l'azoture) en présence de triphényl phosphine et d'azodicarboxylate d'éthyle ou le phthalimide de potassium dans le diméthylformamide ;
60 - l'agent de réduction que l'on fait réagir avec le produit de formule (X) est la triphényl phosphine ; on peut également procéder par hydrogénation catalytique, par exemple, en présence de palladium sur charbon actif empoisonné par la quinoléine. L'agent d'hydrolyse du phthalimide pouvant être une base minérale ou
65 l'hydrazine ;

- la suite des opérations auxquelles on soumet le composé de formule (XI) est réalisée de préférence selon les modes de réalisation préférés indiqués ci-dessus pour les différentes étapes de :

- hydrolyse des fonctions esters,
- amidification des fonctions amino libres,
- réduction,
- estérification et salification.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

Le produit de départ de l'exemple 1 a été préparé comme suit :

1-(formylamino) 5-hydroxy 3-méthylène 1,1,5-pentane tricarboxylate de triéthyle.

Stade 1 : 2-(formylamino) (2-méthyl 2-propényl) propanedioate de diéthyle.

On ajoute 40 g de carbonate de potassium, 0,380 g de catalyseur éther couronne 18 crown 6 et 39,9 g de chlorométhyl propène à une solution de 30 g de formamido-malonate d'éthyle dans 300 cm³ d'acétonitrile, agite au reflux pendant 3 heures, filtre, amène à sec, refroidit à 0°/-5°C, reprend dans 10 cm³ d'éther isopropylique, filtre, lave à l'éther isopropylique, sèche sous pression réduite et obtient 25,2 g du produit attendu. F = 72°C.

Stade 2 : 1-(formylamino) 5-hydroxy 3-méthylène 1,1,5-pentane tricarboxylate de triéthyle.

On ajoute goutte à goutte en dix minutes une solution de 26,5 g de glyoxylate d'éthyle dans 180 cm³ de chlorure de méthylène, à une solution de 84 g de chlorure ferrique dans 180 cm³ de chlorure de méthylène, agite une heure, refroidit à -20°C, ajoute goutte à goutte en vingt minutes une solution de 34 g de produit tel qu'obtenu au stade 1 dans 180 cm³ de chlorure de méthylène et agite une heure à -20°C. On verse sur 300 cm³ d'eau glacée, extrait au chlorure de méthylène, lave avec de l'acide chlorhydrique 2N puis à l'eau salée, sèche, amène à sec sous pression réduite et obtient 56,5 g du produit attendu F = 68°C après purification par chromatographie sur silice (éluant : acétate d'éthyle - cyclohexane 6-4).

Exemple 1 : Acide 2-amino 4-méthylène heptanedioïque.

Stade A : 1-(formylamino) 3-méthylène 1,1,5-pentane-tricarboxylate de triéthyle.

On dissout 46 g du produit obtenu lors de la préparation décrite ci-dessus dans 500 cm³ de pyridine, refroidit à 0°C et ajoute goutte à goutte, 12 cm³ de chlorure de méthane sulfonyle, agite 3 heures à température ambiante, verse sur 400 cm³ d'acide chlorhydrique 4N glacé et 200 cm³ de chlorure de méthylène, extrait au chlorure de méthylène, lave avec de l'acide chlorhydrique 4N avec une solution saturée de bicarbonate de soude puis avec de l'eau salée, sèche et évapore à sec sous pression réduite. On obtient un produit A.

On laisse au reflux pendant 6 heures une suspension renfermant 10,8 g de produit A, 100 cm³ de diméthoxyéthane, 10 cm³ d'eau, 18,5 g d'iodure de sodium et 16 g de zinc en poudre.

On refroidit la suspension, filtre le précipité, ajoute de l'eau, extrait au chlorure de méthylène, sèche, filtre et amène à sec. On obtient 8,4 g d'une huile que l'on purifie par chromatographie sur silice en éluant par le mélange cyclohexane-acétate d'éthyle (5-5). On obtient 5,75 g de produit recherché.

Spectre RMN CDCl₃ ppm

H des groupements CO₂CH₂CH₃ : 1,25 (t) 1,27 (t) 4,12 et 4,26

H du groupe formyle : 8,18

H du groupe amino : 7,0

H du CH₂ en position 2 du pentane : 3,14 (s)

H du méthylène substitué en position 3 du pentane : 4,8 et 4,9

H des CH₂ en positions 4 et 5 du pentane : CH₂-CH₂ 2,2 à 2,45

Stade B : 1-amino 3-méthylène 1,1,5-pentane-tricarboxylate de triéthyle.

On maintient au reflux, sous agitation pendant 35 minutes, un mélange de 6 g de produit préparé au stade précédent, 60 cm³ d'éthanol et 6 cm³ d'acide chlorhydrique concentré. On évapore la majeure partie de l'éthanol. On refroidit, ajoute de l'eau, neutralise à l'aide de carbonate acide de sodium. On extrait au chlorure de méthylène, lave à l'eau salée, sèche, filtre et amène à sec sous pression réduite.

On obtient ainsi 5,2 g d'une huile que l'on chromatographie sur silice en éluant par le mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (7 - 3).

Spectre RMN CDCl₃ en ppm

H des groupements CO₂CH₂CH₃ : 1,25 (t) et 1,28 (t) 4,12 (q) et 4,23 (q)

H du groupe : NH₂ : 2,04 (s)

H du CH₂ en position 2 du pentane : 2,80 (s)

H du méthylène substitué en position 3 du pentane : 4,99 et 4,95

H des CH₂ en positions 4 et 5 du pentane : 2,28 m et 2,45 m

Stade C : acide 2-amino 4-méthylène heptanedioïque.

On ajoute goutte à goutte 9,9 cm³ d'une solution de soude N dans une solution renfermant 945 mg de 1-amino 3-méthylène 1,1,5-pentanetricarboxylate de triéthyle préparé au stade précédent et 10 cm³ d'éthanol. On maintient le mélange réactionnel sous agitation pendant 16 heures à température ambiante et amène à sec sous pression réduite. On reprend le résidu dans 10 cm³ d'eau et ajoute 2 cm³ d'acide acétique pur. On maintient le mélange réactionnel sous agitation à 80°C pendant deux heures et amène à sec. On obtient 830 mg d'un produit que l'on purifie par passage sur résine Dowex 50 W x 8 (éluant eau puis ammoniacque 0,4N). Après passage sur cellulose de 290 mg de résidu (éluant : méthanol -eau (9-1)), on obtient 160 mg du produit recherché.

Spectre RMN D₂O ppm

H du CH en position 2 de l'acide heptanedioïque : 3,89 (dd J = 4 et 10)

H du CH₂ en position 3 de l'acide heptanedioïque : 2,51 (dd) 2,77 (dd)

H du méthylène substitué en position 4 de l'acide heptanedioïque : 5,00 et 5,02

H des CH₂ en positions 5 et 6 de l'acide heptanedioïque : 2,3 à 2,5 ppm.

Exemple 2 : Acide 2-(L-alanyl amino) 4-méthylène heptanedioïque.

Stade A : 1-[[N-(1,1-diméthyléthoxycarbonyl) L-alanyl] amino] 3-méthylène 1,1,5-pentanetricarboxylate de triéthyle.

On refroidit à 0°C une solution renfermant 945 mg du produit préparé au stade B de l'exemple 1, 30 cm³ de diméthoxyéthane, 621 mg de Boc-L-alanine et ajoute par petites fractions en 10 minutes, 678 mg de dicyclohexylcarbodiimide. On laisse sous agitation à 0°C pendant 16 heures. On filtre, et amène le filtrat à sec sous pression réduite. On chromatographie sur silice en éluant par le mélange cyclohexane -acétate d'éthyle (7-3). On obtient 1,3 g du produit recherché. $\alpha_D = -22^\circ \pm 2^\circ$ c = 0,7 % CH₂Cl₂

Spectre RMN CDCl₃ ppm

H des groupements CO₂CH₂CH₃ : $\begin{cases} 1,25 \text{ (t)} - 1,26 \text{ (t)} \\ 4,05 \text{ à } 4,35 \end{cases}$

H des CH₃ de $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$: 1,45 (s)

H du CH du groupe L-alanyl : 4,05 à 4,35 ppm

H du CH₃ du groupe L-alanyl : 1,35 (d)

H du CH₂ en position 2 du pentane : 3,12

H du méthylène substitué en position 3 du pentane : 4,77 et 4,86

H des CH₂ en positions 4 et 5 du pentane : 2,23 - 2,40

Stade B : Acide 2-(L-alanyl amino) 4-méthylène heptanedioïque.

On ajoute à 0°C goutte à goutte, 3,9 cm³ d'une solution de soude N dans une solution renfermant 580 mg du produit préparé au stade A et 5 cm³ d'éthanol. On maintient le mélange réactionnel sous agitation pendant 4 heures. On amène à sec sous pression réduite. On reprend le résidu dans l'éthanol. On essore le sel formé, lave et sèche. On obtient 580 mg d'un produit que l'on dissout dans 2 cm³ d'eau.

On ajoute à la solution obtenue de la résine Amberlyst 15 jusqu'à pH = 3. On filtre, lave à l'eau et amène à sec sous pression réduite. On reprend le résidu par 2,5 cm³ d'eau et 4,5 cm³ d'acide acétique. On maintient le mélange réactionnel sous agitation pendant 2 heures à 80°C et amène à sec sous pression réduite. On obtient 370 mg d'une résine que l'on purifie par chromatographie sur silice, en éluant par le mélange propanol-eau (8-2). On obtient 250 mg de l'amine bloquée sous forme de t-butyl carbamate auxquels on ajoute 2,5 cm³ de chlorure de méthylène et 1 cm³ d'acide trifluoroacétique. On laisse 3 heures sous agitation à la température ambiante et amène à sec sous pression réduite. On purifie le résidu obtenu par chromatographie sur silice en éluant par le mélange propanol-eau (8-2). Après passage sur résine Dowex 50 W x 8, on élue par 250 cm³ d'eau distillée puis avec de l'ammoniacque 0,4N et obtient 126 mg du produit recherché. $\alpha_D = +3^\circ \pm 1,5$ (c = 0,6 % H₂O)

Spectre RMN D₂O ppm

H du CH₃ du groupe L-alanyl : 1,49 (d) dédoublé
 H du CH du groupe L-alanyl : 4,09 (q) dédoublé
 H du CH en position 2 de l'acide heptanedioïque : 4,36
 H du méthylène substitué en position 4 de l'acide heptanedioïque : 4,85 et 4,89
 H des CH₂ en positions 5 et 6 de l'acide heptanedioïque : 2,2 à 2,7.

5

Exemple 3 : Acide 2-[(gamma-D glutamyl)amino] 4-méthylène heptanedioïque.

Stade A : 3-méthylène 1-[[O-méthyl N-(trifluoroacétyl) gamma-D glutamyl]amino] 1,1,5-pentanetricarboxylate de triéthyle.

10

On refroidit à 0°C, une solution renfermant 1,27 g du produit préparé au stade B de l'exemple 1, 50 cm³ de diméthoxyéthane et 1,22 g d'acide (N-trifluoroacétyl)-D-glutamate de 1-méthyle. On ajoute par petites fractions 1,06 g de dicyclohexylcarbodiimide et laisse 16 heures sous agitation à 0°C. On filtre le précipité formé et amène à sec sous pression réduite. On obtient 2,4 g de résidu que l'on chromatographie sur silice en éluant par le mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (6-4). On obtient 1,6 g du produit recherché (rf. = 0,3).
 $\alpha_D^{20} = + 11^\circ 5' \pm 1,5^\circ$
 (c = 0,65% CH₂Cl₂)

15

Spectre RMN CDCl₃ ppm

20

H des groupements CO₂CH₂CH₃ : 1,18 à 1,31 4,11 (q) et 4,25 (q)
 H du CH₃ de CO₂CH₃ : 3,77 (s)
 H de CH du gamma-glutamyl : 4,50 (dt)
 H du CH₂ en position 2 du pentane : 3,11 (s)
 H du méthylène substitué en position 3 du pentane : 4,75 et 4,87
 H des CH₂ en positions 4 et 5 du pentane : 2,05 à 2,50.

25

Stade B : Acide 2-[(gamma-D-glutamyl)amino] 4-méthylène heptanedioïque.

On ajoute à 0°C 11,8 cm³ de soude N dans une solution renfermant 1,1 g du produit préparé au stade A et 50 cm³ d'éthanol. On laisse le mélange réactionnel sous agitation pendant 16 heures. On amène à sec et obtient un résidu que l'on reprend avec 10 cm³ d'eau et 2 cm³ d'acide acétique pur. On maintient le mélange sous agitation pendant 4 heures à 80°C. On mène à sec sous pression réduite. On obtient 1,8 g d'un produit que l'on purifie sur silice en éluant par le mélange éthanol - ammoniacal (90 - 10). On isole 510 mg du produit recherché brut que l'on purifie en le reprenant dans l'éthanol jusqu'à l'obtention du précipité blanc. On essore et sèche sous pression réduite. On obtient un produit que l'on dissout dans l'eau, filtre et lyophilise. On obtient après 2 lyophilisations successives 280 mg du produit recherché. $\alpha_D^{20} = -12^\circ \pm 1,5^\circ$ (c = 0,7% H₂O)

30

35

Spectre RMN D₂O ppm

H du méthylène substitué en position 4 de l'acide heptanedioïque : 4,86 - 4,88
 H du CH en position 2 de l'acide heptanedioïque : 4,33
 H du CH du gamma-D-glutamyl : 3,76
 H des CH₂ en positions 5 et 6 de l'acide heptanedioïque : 2,05 à 2,70

40

Exemple 4 : Acide 2-amino 3-heptènedioïque.

45

Stade A : 1-(formyl amino) 2-penten-1,1,5-tricarboxylate de triéthyle.

On ajoute 4,2 g d'iodure de sodium et 3,7 g de zinc dans une solution de 2,4 g du produit A obtenu au stade A de l'exemple 1. On porte le milieu réactionnel dans le diméthoxy éthane au reflux en présence d'eau sous agitation pendant 2 heures. On ajoute 50 ml d'eau. On filtre et extrait au chlorure de méthylène. On sèche et amène à sec sous pression réduite. On obtient 2,3 g de produit brut que l'on chromatographie sur silice en éluant par le mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (5-5). On obtient ainsi 1,6 g du produit recherché.

50

Spectre RMN

H du formyle : 8,1 ppm
 H éthylénique en position 2 : 6,0 - 6,3 ppm
 H éthylénique en position 3 : 5,7 ppm
 H des CH₂ en positions 4 et 5 : 2,3 à 2,5 ppm

55

Stade B : Acide 2-amino 3-heptènedioïque.

On ajoute 0,25 cm³ d'acide chlorhydrique 12N dans une solution renfermant 0,5 g du produit préparé au stade A dans 5 cm³ d'éthanol. On porte le milieu réactionnel au reflux pendant une heure. On laisse refroidir à la température ambiante et ajoute 20 cm³ d'eau. On chasse l'éthanol sous pression réduite. On amène à neutralité à l'aide d'une solution de bicarbonate de potassium à 10%. On extrait à l'acétate d'éthyle. On sèche les phases organiques sur sulfate de magnésium et évapore à sec. On obtient 0,4 g de produit brut.

60

On dissout 0,34 g du produit ainsi obtenu dans 10 cm³ d'éthanol à 0°C et ajoute goutte à goutte 3,2 cm³

65

d'une solution de soude N. On laisse le milieu réactionnel sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante. On amène à sec. On reprend le résidu par 5 cm³ d'eau. On ajoute 0,2 cm³ d'acide acétique. On abandonne la solution obtenue pendant 16 heures sous agitation à la température ambiante et amène à sec.

On purifie le produit obtenu par passage sur cellulose (éluant : propanol - eau 9-1, 8-2 et 7-3), filtration sur gel d'exclusion, passage sur résine échangeuse d'ions. On obtient 0,110 g du produit recherché.

Spectre RMN D₂O

H du CH en position 2 : 4,20

H éthyléniques : 5,59 dd $j = 8$ et 15,5 5,98 d $j = 15,5$ et 6.

H des CH₂ en positions 5 et 6 : 2,25 à 2,42.

Exemple 5 : Acide 6-amino 3-heptènedioïque.

Stade A : 6-hydroxy 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.

On ajoute en 15 minutes, à 0° / +6°C, une solution de 40 g de 4-penténoate de méthyle dans du chlorure de méthylène, dans une suspension renfermant 71,5 g de glyoxylate d'éthyle dans un litre de chlorure de méthylène et 115 g de chlorure ferrique. On laisse en contact pendant 15 minutes à 0° + 5°C. On laisse remonter à la température ambiante. On verse sur de la glace. On décante et lave la phase CH₂Cl₂ avec de l'acide chlorhydrique N. On sèche sur sulfate de magnésium. On évapore et obtient 84 g de produit brut.

On purifie sur silice (éluant : cyclohexane - acétate d'éthyle (7-3).

On obtient le produit recherché. Rendement 70 %.

Stade B : 6-[méthyl sulfonyl)oxy] 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.

On dissout 1,5 g du produit préparé au stade A dans 15 cm³ de chlorure de méthylène à la température ambiante. On ajoute 15,6 cm³ de pyridine et 0,7 cm³ de chlorure de méthane sulfonyl. On agite 16 heures à la température ambiante. On verse lentement le milieu réactionnel sur une solution d'acide chlorhydrique 6N additionnée de chlorure de méthylène. On extrait au chlorure de méthylène. On lave à l'aide d'une solution de carbonate acide de sodium. On sèche et évapore à sec. On purifie le résidu par chromatographie sur silice en éluant par le mélange chlorure de méthylène - acétate d'éthyle (9-1).

On réunit et amène à sec les fractions contenant le produit désiré. On obtient 0,3 g du produit recherché. Rf. = 0,45 dans le système CH₂Cl₂ - AcOEt (85-15).

Spectre RMN (ppm)

H de SO₂CH₃ : 3,15

H de CO₂CH₂CH₃ : 1,31 et 4,26

H du CH en position 6 : 5,05

H de CH₂ en position 5 : 2,55 à 2,8

H éthyléniques : 5,56 et 5,74

H de CO₂CH₃ : 3,68

H du CH₂ en position 2 : 3,08

Stade C : 6-azido 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.

On dissout 1,6 g du produit préparé au stade précédent dans 20 cm³ de diméthyl formamide, on ajoute 0,39 g d'azoture de sodium NaN₃ et agite 16 heures à la température ambiante. On évapore le diméthyl formamide à 35°C maximum et reprend le résidu obtenu par le chlorure de méthylène. On lave à l'acide d'une solution de carbonate acide de sodium à 10 % puis avec de l'eau salée. On sèche et évapore à sec. On obtient 1,25 g de résidu que l'on chromatographie sur silice en éluant par le mélange acétate d'éthyle - cyclohexane (3-7). On amène à sec les fractions intéressantes. On obtient 1,03 g du produit recherché. Rf. = 0,3 dans un mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (8-2).

Spectre RMN.

H éthyléniques : 5,55 et 5,75 ppm

H de CO₂CH₃ : 3,69 ppm

H du CH₂ en position 2 : 3,08 ppm

H du CH₂ en position 5 : 2,45 à 2,65 ppm

H de CO₂Et : 1,31 ppm et 4,25 ppm

H du CH en position 6 : 3,88 ppm

Stade D : 6-amino 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.

On dissout 21,1 g du produit obtenu au stade précédent dans 350 cm³ de tétrahydrofuranne. On refroidit à 0°C et ajoute 27,5 g de triphényl phosphine. On agite à la température ambiante pendant 5 heures. On ajoute 23,6 cm³ d'eau et agite à la température ambiante pendant 16 heures. On évapore le tétrahydrofuranne. On reprend le résidu dans le chlorure de méthylène et extrait deux fois à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 2N. On neutralise avec du carbonate acide de sodium et extrait au chlorure de méthylène. On lave à l'eau salée, sèche et évapore à sec. On obtient 16,2 g du produit recherché.

Rf. = 0,25 dans acétate d'éthyle - éthanol (9-1).

Spectre RMN CDCl₃

H de NH₂ : 1,61 ppm
 H du CH en position 6 : 3,51 ppm
 H de CO₂Et : 1,28 et 4,18 ppm
 H du CH₂ en position 5 : 5,52 et 5,68 ppm
 H du CH₂ en position 2 : 3,07 ppm.

Stade E : Acide 6-amino 3-heptènedioïque.

On dissout 1 g du produit obtenu au stade précédent dans 10 cm³ d'éthanol. On ajoute 5,1 cm³ d'une solution de soude 2N. On agite 16 heures à la température ambiante. On évapore à sec sous pression réduite. On désalcalinise le produit obtenu sur résine Dowex 50 W x 8. On évapore à sec les fractions contenant le produit désiré. On obtient un produit que l'on lyophilise dans 150 cm³ d'eau bidistillée filtrée. On obtient 660 mg du produit recherché. Rf. = 0,5 dans le mélange BuOH-AcOH-H₂O (4-2-2).

Spectre RMN D₂O

H éthyléniques : 5,46 ppm - 5,80 ppm
 H du CH₂ en position 5 : 2,49 à 2,76 ppm
 H du CH en position 6 : 3,79 ppm
 H du CH₂ en position 2 : 2,98 ppm

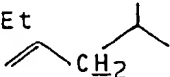
Exemple 6 : Acide 6-(L-alanyl-amino) 3-heptènedioïque.

Stade A : 6-[[N-(1,1-diméthyléthoxy)carbonyl] L-alanyl-amino] 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.

On dissout 3,9 g du produit obtenu au stade D de l'exemple 5 dans 200 cm³ de diméthoxy éthane. On ajoute 3,63 g de N-Boc L-alanine. On refroidit à -5° 0°C. On ajoute 3,99 g de dicyclohexylcarbodiimide et agite vigoureusement 16 heures à 0°C. On filtre et évapore à sec. On reprend dans du diméthoxy éthane et filtre. On évapore à sec et reprend dans le chlorure de méthylène. On lave avec une solution saturée de bicarbonate de soude puis avec de l'eau salée, sèche et évapore à sec. On obtient 7,7 g du produit recherché brut que l'on chromatographie sur silice en éluant par le mélange cyclohexane -acétate d'éthyle (7-3). On obtient 5,4 g du produit recherché.

alpha_D = -18,5 ± 1° (c = 1,6% CH₂Cl₂)

Spectre RMN CDCl₃

H des CH₃ de C(CH₃)₃ : 1,45 ppm
 H de CO₂Et : 1,43 et 4,20 ppm
 H de  : 2,4 à 2,7 ppm

H du CH₂ en position 2 : 3,05 ppm
 H de CO₂CH₃ : 3,17 et 6,68 ppm
 H éthyléniques : 5,42 et 5,62 ppm
 H du CH₃ du fragment L-alanyl: 1,36 et 1,35 ppm.

Stade B : Acide 6-(L-alanyl-amino) 3-heptènedioïque.

On dissout 790 mg du produit obtenu au stade A dans 20 cm³ d'éthanol à la température ambiante.

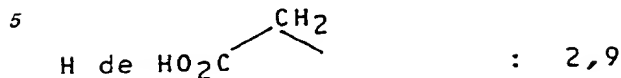
On refroidit au bain de glace et ajoute 2,4 cm³ d'une solution de soude 2N. On agite à la température ambiante pendant 2 heures 30. On amène à pH 6 à l'aide d'une solution concentrée d'acide chlorhydrique et évapore à sec. On reprend le résidu obtenu dans 10 cm³ de dioxanne et ajoute 1 cm³ d'une solution d'acide chlorhydrique 12N.

On agite la suspension obtenue pendant 30 minutes à 70°C. On filtre le précipité et évapore à sec le filtrat. On reprend le résidu par 2 cm³ d'eau, amène le pH à 6 avec de la soude N, passe sur résine échangeuse d'ions (H⁺) élue à l'eau puis à l'ammoniaque 0,5N et évapore à sec les fractions contenant le produit désiré. On obtient 420 mg d'un produit que l'on reprend dans l'eau bidistillée, filtrée et lyophilise. On obtient 370 mg du produit recherché.

Rf. = 0,5 en éluant avec le mélange BuOH-AcOH-H₂O (4-2-2).

alpha_D = -4° ± 1° (c = 1% HCl5N)

Spectre RMN CD₃OD (ppm)
H éthyléniques : 5,42 - 5,65



10
H du CH₂ en position 2 : 2,37 - 2,64
H du CH en position 6 : 4,29
H du CH du fragment L-alanyl : 3,95
H du CH₃ du fragment L-alanyl : 1,47

15
Exemple 7 : 6-[[N-[(1-oxo octadécyl) L-alanyl] O-méthyl gamma-D-glutamyl] amino] 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.

On refroidit à 10-12°C une solution renfermant 1,99 g de [N-(1-oxo octadécyl) L-alanyl] D-glutamate de 1 méthyle et 70 cm³ de tétrahydrofurane anhydre. On ajoute 1,16 cm³ de triéthylamine et 0,6 cm³ de chloroformiate d'isobutyle. On laisse sous agitation à 10-12°C pendant 35 minutes et ajoute 0,86 g du produit obtenu au stade D de l'exemple 5 et 10 cm³ de tétrahydrofurane anhydre.

On laisse sous agitation à la température ambiante pendant 2 heures. On ajoute de la glace, extrait au chlorure de méthylène, lave à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique N et à l'eau salée, sèche et évapore à sec sous pression réduite. On obtient 2,9 g du produit recherché brut que l'on purifie par chromatographie sur silice en éluant par le mélange CH₂Cl₂-MeOH (98-2). On obtient 1,8 g de produit recherché.

F = 110°C.

alpha_D = -14,5° ± 2° CH₂Cl₂ c = 0,5%

Spectre RMN CDCl₃ (ppm)

30 - 0,88 (t) : CH₃ de la chaîne
- 1,25 : (CH₂)_n et CH₃ éthyle
- 1,38 - 1,39 : CH₃-CH
- 1,9 à 2,4 : (CH₂)₂-CH et CH₂-C=O
- 2,55 : =C-CH₂-CH
35 - 3,06 : =C-CH₂-C=O
- 3,65 - 3,68 et 3,73 : CO₂CH₃
- 4,21 : -CH₂-CH₃
- 4,4 à 4,7 : N-CH- $\begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$
40 (3H)
- 5,46 et 5,67 : les H éthyléniques (J = 15Hz)

45 - 6,14 - 6,15 }
- 6,50 - 6,86 } : les NH-C=O
50 - 7,32 - 7,26 }

Exemple 8 : Acide 6-[[N-[(1-oxo octadécyl) L-alanyl] gamma-D-glutamyl] amino] 3-heptènedioïque (sel de sodium).

55 On ajoute à 0°C, 3,6 cm³ d'une solution de soude N dans une solution renfermant 800 mg du produit obtenu à l'exemple 7 et 15 cm³ d'éthanol. On maintient le mélange réactionnel sous agitation pendant 2 heures à la température ambiante. On amène à sec sous pression réduite sans chauffer. On reprend le résidu obtenu dans l'eau, filtre et lyophilise. On obtient 775 mg du produit recherché fondant à 200°C (P.F. peu net).
alpha_D = -26° ± 2° (c = 0,5% H₂O)

60 Spectre RMN D₂O (ppm)

- 0,89 (t) : CH₃ de la chaîne
- 1,40 (t) : CH₃-CH
- 1,9 à 2,5 : (CH₂)₂-CH ; C=C-CH₂-CH ; -CH₂-C=O
65 - 2,93 (d, J = 7) : $\begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ -CH₂-C=C

- 4,38 (q, J=7) : N- $\begin{array}{c} \text{CH} - \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$

- 4,17 (m) : les autres N-CH-C=O

5

- 5,46 } : H éthyléniques (E) J \approx 15Hz
5,67 }

10

Exemple 9 : Acide 6-(L-lysyl amino) 3-heptènedioïque.

15

Stade A : N,N'-bis[(1,1-diméthyléthoxy) carbonyl] L-lysine.

On dissout 1,46 mg de lysine dans une solution de 0,4 g de soude en pastilles dans 1 cm³ d'eau. On ajoute 2 cm³ de tert-butanol. On introduit goutte à goutte le (BOC)₂O. On agite la suspension obtenue pendant 4 heures à la température ambiante. On dilue à l'eau, amène à pH 4 au moyen d'une solution d'hydrogénosulfate de potassium (10 g/300 cm³ d'eau). On extrait à l'acétate d'éthyle, lave à l'eau salée jusqu'à neutralité, sèche et évapore à sec. On obtient 2,35 g de produit recherché.

20

$\alpha_{\text{D}}^{20} = +12^\circ \pm 1^\circ$ (c = 1% H₂O)

Spectre RMN CDCl₃

H des groupes tert-butyles : 1,45 - 1,47 - 1,52 ppm

25

H du CH₂ en position 6 de la lysine : 3,12 ppm

H du CH en position 2 de la lysine : 4,12 et 4,30 ppm

Stade B : 6-[[N,N'-bis[(1,1-diméthyléthoxy) carbonyl] L-lysyl] amino] 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.

30

On dissout 1,74 g du produit préparé au stade A et 1,076 g de 6-amino 3-heptène dioate de (7) éthyle et de (1) méthyle dans 80 cm³ de diméthoxyéthane. On refroidit à 0°C et introduit une solution de 1,03 g de dicyclohexylcarbodiimide dans 20 cm³ de diméthoxyéthane. On agite pendant 16 heures à 0°C. On filtre et amène à sec le filtrat. On obtient 2,9 g de produit recherché brut que l'on purifie par chromatographie sur silice en éluant par le mélange acétate d'éthyle - cyclohexane (1-1). On amène à sec les fractions contenant le produit et obtient 1,78 g de produit recherché.

35

$\alpha_{\text{D}}^{20} = -14^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,65% CH₂Cl₂)

Spectre RMN CDCl₃ (ppm)

H de C(CH₃)₃ : 1,44 - 1,45

40

H de CO₂CH₃ : 3,68 - 3,69

H de CO₂CH₂CH₃ : 4,20 (m)

H de CO₂CH₂CH₃ : 1,28 (t)

H du CH₂ en position 2 du fragment heptènedioïque : 3,05 (d)

H du CH₂ en position 5 du fragment heptènedioïque : 2,55 (m)

45

H des CH en position 2 du fragment lysyl et en position 6 du fragment heptènedioïque : 4,1 - 4,60.

Stade C : Sel de sodium de l'acide 6-[[N,N'-bis[(1,1-diméthyl éthoxy) carbonyl] L-lysyl] amino] 3-heptènedioïque.

50

On ajoute à 0°C, 6 cm³ d'une solution de soude N dans une solution de 1,47 g du produit préparé au stade précédent et 25 cm³ d'éthanol. On agite une heure trente minutes à 0°C puis deux heures trente à température ambiante. On évapore à la température ambiante sous pression réduite. On obtient 1,57 g du produit recherché.

Spectre RMN D₂O (ppm)

55

H des C(CH₃)₃ : 1,43 - 1,45

H des CH₂ en position 6 des fragments lysyl : 3,08 (t)

H des CH en position 2 des fragments lysyl et en position 6 du fragment heptènedioïque : 4,03 (m) - 4,22 (m)

H éthyléniques : 5,14 (m) - 5,60 (m)

H du CH₂ en position 2 du fragment heptènedioïque : 2,93 (d)

60

Stade D : 6-[[N,N'-bis[(1,1-diméthyléthoxy) carbonyl] L-lysyl] amino] 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.

On dissout 1,16 g du produit obtenu au stade précédent dans 17 cm³ de dioxanne. On ajoute 1,7 cm³ d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée. On porte à 70°C pendant 30 minutes. On évapore à sec. On dilue

65

à l'eau, amène à pH 6 par addition de bicarbonate de sodium. On purifie par passage sur résine échangeuse d'ions Dowex 50 W x 8 et élue à l'eau puis à l'ammoniaque 0,2N. On évapore à sec et lyophilise. On obtient 536 mg du produit recherché.
 $\alpha_D = + 15^\circ \pm 1^\circ \text{ c} = 1\% \text{ H}_2\text{O}$

Spectre RMN D₂O (ppm)

H de HO₂C-CH₂- : 2,88 à 3,04

H éthyléniques : 5,46 - 5,69

H du CH₂ en position 2 du fragment heptènedioïque : 2,4 à 2,7

H du CH en position 6 du fragment heptènedioïque : 4,25

H du CH en position 2 des fragments lysyl : 4,02.

H du CH₂ en position 6 des fragments lysyl : 2,88 à 3,04.

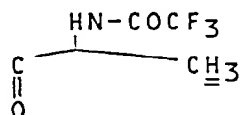
Exemple 10 : Acide 6-[(L-alanyl gamma-D-glutamyl)amino] 3-heptènedioïque.

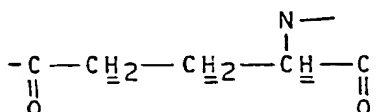
Stade A : 6-[[N-[N-trifluoroacétyl]L-alanyl] (O-méthyl) gamma-D-glutamyl] amino] 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.

On ajoute à 12°C, 0,62 cm³ de chloroformate d'isobutyle dans une solution renfermant 1,44 g de N-[N-(trifluoroacétyl)]L-alanyl] D-glutamate de 1-méthyle, 1,2 cm³ de triéthylamine et 70 cm³ de tétrahydrofurane. On maintient sous agitation pendant une heure. On ajoute goutte à goutte une solution de 0,9 g dans 30 cm³ de tétrahydrofurane du produit obtenu au stade D de l'exemple 5. On maintient la solution obtenue sous agitation pendant une heure à la température ambiante. On ajoute 20 cm³ d'eau et extrait au chlorure de méthylène. On lave la phase chlorométhylénique avec 20 cm³ d'acide chlorhydrique N, sèche, amène à sec. On obtient 2,2 g d'un produit que l'on purifie par chromatographie sur silice en éluant dans le mélange chlorure de méthylène - acétate d'éthyle (4-6). On obtient 1,32 g de produit qu'on empâte à l'éther isopropylique et obtient 1,12 g du produit recherché.
 $F = 70^\circ\text{C}$.

Spectre RMN CDCl₃ (ppm)

H de CO₂CH₂CH₃ : 1,29 (d)

H de  : 1,48 (d)

H de  : 2,01 à 2,45

H de  : 2,56

H de =CH-CH₂-CO₂CH₃ : 3,07

H de CO₂CH₃ : 3,69 - 3,70 et 3,75
 (glutamyl OCH₃)

H de  : 4,42 à 4,66 (alanyl)

H éthyléniques : 5,42 et 5,66 (m)

H des NH : 6,40 (d), 6,50 (d), 7,46 et 7,88.

Stade B : Acide 6[(L-alanyl gamma-D-glutamyl) amino] 3-heptènedioïque.

On ajoute goutte à goutte 6,4 cm³ d'une solution de soude N dans une solution renfermant 0,8 g du produit préparé au stade précédent et 16 cm³ d'éthanol à 0°C. On laisse la solution obtenue sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante. On amène à pH 7 avec de l'acide acétique. On concentre la solution sous pression réduite, ajoute 5 cm³ d'eau au résidu et purifie par passage sur résine échangeuse d'ions Dowex 50 W x 8 ; on élue avec de l'ammoniaque 0,2N, lyophilise et obtient 0,545 g du produit recherché.
 $\alpha_{D}^{20} = +4^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (c = 1% H₂O)

Spectre RMN

H du CH₃ du fragment alanyl : 1,47 (d) - 1,49 (d)

H du CH₂ en position 2 du fragment heptènedioïque : 2,91 (d)

H du CH₂ en position 5 du fragment heptènedioïque et des CH₂ du fragment glutamyl : 1,89 à 2,60

H du CH du fragment alanyl : 3,94

H du CH du fragment glutamyl : 4,15 à 4,30

H éthyléniques : 5,45 et 5,66

Exemple 11 : Acide 2-amino 2-méthyl 4-méthylène heptanedioïque.

Stade A : (2-méthyl 2-propényl) propanedioate de diéthyle.

On dissout 50 g de 2-méthyl malonate de diéthyle dans 500 cm³ d'acétonitrile, ajoute 80 g de carbonate de potassium, 800 mg d'éther couronne (18 crown 6) puis 75 g de 3-chloro 2-méthyl 1-propène, agite et porte au reflux pendant 8 heures. On filtre l'insoluble et concentre à sec le filtrat. On chromatographie le résidu sur silice, élue par un mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (9-1) et obtient 28,3 g de produit pur et 32 g de mélange. On chromatographie ce dernier sur silice en éluant par un mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (9-1) et isole encore 16,5 g de produit attendu.

Rf. = 0,3 dans cyclohexane - acétate d'éthyle (9-1).

Stade B : méthyl (2-méthyl 2-propényl) propanedioate de monoéthyle.

On refroidit à 0°C, 27 g de méthyl (2-méthyl 2-propényl) propanedioate de diéthyle dans 250 cm³ d'éthanol, ajoute goutte à goutte 65 cm³ de soude 2N et agite 24 heures à température ambiante.

On verse le mélange réactionnel sur 30 cm³ d'acide chlorhydrique 6N glacé, extrait à l'acétate d'éthyle et évapore à sec. On reprend le résidu par du chlorure de méthylène, extrait avec une solution aqueuse à 10% de bicarbonate de soude, acidifie avec de l'acide chlorhydrique concentré et extrait à l'acétate d'éthyle. On lave la phase organique à l'eau salée, sèche, évapore à sec et obtient 24 g de produit attendu. Rf = 0,4 dans CH₂Cl₂-MeOH (9-1).

Stade C : 2,4-diméthyl 2-[(méthoxycarbonyl) amino] 4-penténoate d'éthyle.

On dissout 27,5 g de produit obtenue comme ci-dessus dans 150 cm³ de chlorure de thionyle, agite 3 heures au reflux et amène à sec sous pression réduite et obtient 30 g de chlorure d'acide. On dissout 14,5 g de ce dernier dans 100 cm³ d'acétone, refroidit à 0°C, ajoute goutte à goutte 5,187 g d'azoture de sodium en solution dans 40 cm³ d'eau, agite une heure à 0°C. On évapore l'acétone, extrait à l'éther, sèche, évapore à sec et obtient 25 g d'azoture.

On dissout ce dernier dans 200 cm³ de méthanol, agite au reflux pendant 16 heures, évapore à sec, reprend le résidu par du chlorure de méthylène, lave la phase organique à l'eau salée, sèche, évapore à sec et obtient 22 g de produit brut. On chromatographie celui-ci sur silice en éluant avec un mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (8-2) et isole 11,2 g de produit attendu.

Rf. = 0,4 dans cyclohexane - acétate d'éthyle (8-2).

Stade D : 6-hydroxy 2-[(méthoxycarbonyl) amino] 2-méthyl 4-méthylène heptanedioate de diéthyle.

A une suspension de 30,5 g de chlorure ferrique dans 150 cm³ de chlorure de méthylène, on ajoute goutte à goutte 9,9 g de glyoxylate d'éthyle 150 cm³ de chlorure de méthylène et agite 30 minutes à température ambiante. On refroidit à -60°C et ajoute goutte à goutte 11,1 g de produit obtenu en C dans 150 cm³ de chlorure de méthylène. On laisse remonter à -30°C. On verse le mélange réactionnel sur 400 cm³ d'eau glacée et extrait au chlorure de méthylène. On lave la phase organique à l'eau avec une solution aqueuse à 10% de bicarbonate de sodium puis à l'eau salée, sèche et évapore à sec. On obtient 15,3 g de produit brut correspondant à un mélange : 65% du produit attendu et 35% du produit 4-méthyle heptène. Après passage sur silice (éluant : cyclohexane - acétate d'éthyle (7-3), on obtient 11,4 g du mélange purifié.

Rf. = 0,25 dans cyclohexane - acétate d'éthyle (6-4).

Stade E : 2-[(méthoxycarbonyl) amino] 2-méthyl 4-méthylène 6-[(méthylsulfonyl) oxy] heptanedioate d'éthyle.

On dissout 11,4 g de produit obtenu précédemment dans 150 cm³ de pyridine, refroidit à 0°C et ajoute 4,9 g de chlorure de méthanesulfonyl, agite une heure à 0°C et 5 heures à température ambiante. On verse sur de l'acide chlorhydrique 6N, extrait à l'acétate d'éthyle, lave la phase organique à l'acide chlorhydrique 6N, avec une solution aqueuse à 10% de bicarbonate de soude puis à l'eau salée. On sèche et évapore à sec. On chromatographie le résidu sur silice, élue avec un mélange chlorure de méthylène - acétate d'éthyle (9-1) et

sépare 6 g de produit attendu, 6 g de mélange de "4-méthylène heptane" et "4-méthyl heptène" et 0,7 g de "4-méthyl heptène". Après une 2ème chromatographie dans les mêmes conditions de la fraction mélange, on isole 3,5 g de produit attendu, 1 g de mélange et 1,1 g de produit 4-méthyl heptène.

Rf. dans CH_2Cl_2 - acétate d'éthyle 9-1 :

- 5 0,4 pour le produit 4-méthylène heptane,
0,35 pour le produit 4-méthyl heptène.

Stade F : 2-[(méthoxycarbonyl) amino] 2-méthyl 4-méthylène heptanedioate de diéthyle.

- 10 On dissout 1,5 g de produit obtenu ci-dessus dans 20 cm³ de diméthoxyéthane, on ajoute successivement 2 cm³ d'eau, 2,75 g d'iodure de sodium et 2,4 g de zinc, agite et porte au reflux pendant 8 heures. On filtre, lave l'insoluble à l'eau, au chlorure de méthylène, extrait le filtrat au chlorure de méthylène, lave la phase organique à l'eau salée, sèche et évapore à sec. On chromatographie le résidu sur silice, élue par un mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (8-2) et isole 0,85 g de produit attendu.

Rf. = 0,25 dans cyclohexane - acétate d'éthyle (8-2).

15

Stade G : Acide 2-amino 2-méthyl 4-méthylène heptanedioïque.

- 20 On dissout 420 mg de produit obtenu au stade F dans 5 cm³ d'éthanol, ajoute 1,66 cm³ de soude 2N et agite 2 heures à température ambiante. On évapore l'éthanol, reprend le résidu par 5 cm³ de soude 2N, agite et porte au reflux pendant 20 heures. On concentre à sec, reprend dans l'eau et neutralise avec de l'acide chlorhydrique 2N. On passe la solution sur résine échangeuse d'ions Dowex 50 W x 8(H⁺), élue à l'eau puis à l'ammoniacque 0,7N. On concentre à sec les fractions intéressantes, reprend dans 10 cm³ d'eau, lyophilise 16 heures et obtient 250 mg de produit attendu.

Rf. = 0,5 dans BuOH - AcOH - H₂O (4-2-2).

25

Spectre RMN (D₂O) ppm

3,85 : du CH₂ en position 6

5,17 - 5,23 et 5,22 - 5,27 : H du méthylène substitué en position 4

1,54 : H du CH₃ substitué en position 2

2,4 à 2,9 : les CH₂

30

Exemple 12 : acide 2-amino 2-(difluorométhyl) 4-méthylène heptanedioïque.

Stade A : (2-méthyl 2-propényl) propanedioate de (1) (1,1-diméthyléthyle) et de (3) éthyle.

- 35 On dissout 33 g de malonate d'éthyle et de terbutyle dans 400 cm³ d'acétonitrile, ajoute en agitant 29 g de carbonate de potassium, 0,5 g d'éther couronne (18-6) et 300 g de 3-chloro 2-méthyl 1-propène puis agite 16 heures à 65°C. On filtre l'insoluble et évapore à sec le filtrat. On chromatographie le résidu sur silice, élue par un mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (95-5) et isole 18 g de produit pur et 22g de mélange. On chromatographie celui-ci sur silice élue par un mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (97,5 - 2,5) et isole encore 11 g de produit.

40

Rf. = 0,35 dans cyclohexane - acétate d'éthyle (95-5).

Stade B : (Difluorométhyl) (2-méthyl 2-propényl) propane dioate de (1) (1,1-diméthyléthyl) et de (3) éthyle.

- 45 On met en suspension 2,8 g d'hydruure de sodium dans 100 cm³ de tétrahydrofurane, ajoute goutte à goutte 11,1 g de produit obtenu au stade A dans 100 cm³ de tétrahydrofurane et agite une heure à 42°C. On fait barboter du Fréon 22 pendant 15 minutes en agitant à 45°C et agite encore une heure à 45°C et une heure à température ambiante sous atmosphère de Fréon 22. On hydrolyse le milieu réactionnel avec de l'eau salée, extrait au chlorure de méthylène, lave la phase organique à l'eau salée, sèche et concentre à sec. On obtient 13 g de produit attendu.

Rf. = 0,4 dans cyclohexane - acétate d'éthyle (95-5).

50

Stade C : (Difluorométhyl) (2-méthyl 2-propényl) propane dioate de monoéthyle.

- 55 On dissout 13 g de produit obtenu ci-dessus dans 100 cm³ de chlorure de méthylène, ajoute 70 cm³ d'acide trifluoroacétique et agite une heure 30 minutes à température ambiante. On concentre à sec sous pression réduite, reprend le résidu par du chlorure de méthylène et extrait avec une solution aqueuse à 10% de bicarbonate de sodium. On lave la phase aqueuse avec du chlorure de méthylène et neutralise avec de l'acide chlorhydrique concentré. On extrait au chlorure de méthylène, lave à l'eau salée, sèche et concentre à sec et obtient 5,3 g de produit attendu.

Rf. = 0,5 dans CH_2Cl_2 - MeOH - AcOH (9 - 0,5 - 0,5).

60

Stade D : 2-(difluorométhyl) 2-(formylamino) 4-méthyl 4-penténoate d'éthyle.

On agite 10,5 g de produit obtenu ci-dessus dans 60 cm³ de chlorure de thionyle et chauffe au reflux pendant 3 heures. On évapore à sec, reprend le résidu dans le toluène et sèche sous pression réduite et obtient 10,5 g de chlorure d'acide.

- 65

On dissout ce dernier dans 50 cm³ d'acétone, refroidit à 0°C, ajoute goutte à goutte, une solution de 3,35 g d'azoture de sodium dans 20 cm³ d'eau et agite pendant une heure à 0°C. On évapore l'acétone, extrait à

l'éther, lave à l'eau salée, sèche, évapore à sec et obtient 10 g d'azoture.

On dissout ce dernier dans 100 cm³ d'acide formique et chauffe au reflux pendant une heure trente minutes. On laisse revenir à température ambiante et ajoute goutte à goutte 40 cm³ d'anhydride acétique et agite 3 heures à température ambiante. On ajoute lentement 40 cm³ d'eau glacée, évapore à sec et reprend dans un mélange eau - chlorure de méthylène, extrait au chlorure de méthylène, lave avec une solution aqueuse à 10% de bicarbonate de sodium, puis à l'eau salée, sèche et concentre à sec. On chromatographie le résidu sur silice, élue par un mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (85-15) et isole 5 g de produit attendu.

5

Stade E : 2-(fluorométhyl) 2-(formylamino) 6-hydroxy 4-méthylène heptanedioate de diéthyle.

On met en suspension 9,65 g de chlorure ferrique dans 50 cm³ de chlorure de méthylène, ajoute goutte à goutte 3,03 g de glyoxylate d'éthyle dans 50 cm³ de chlorure de méthylène et agite 30 minutes à température ambiante. On refroidit à -60°C et ajoute goutte à goutte 3,5 g de produit obtenu en D dans 50 cm³ de chlorure de méthylène.

10

On agite une heure à -30°C puis une heure à -20°C. On verse le mélange réactionnel sur de l'eau glacée, extrait au chlorure de méthylène, lave à l'eau salée puis avec une solution aqueuse à 10% de bicarbonate de sodium puis à l'eau salée. On sèche et évapore à sec. On chromatographie sur silice le résidu, élue par un mélange cyclohexane - acétate d'éthyle (6-4) et isole 0,590 g de produit B (4-méthyl heptène...) et 1,7 g de produit C (4-méthylène - heptane...) et 1 g de mélange.

15

Produit B : Rf. 0,32 dans cyclohexane - acétate d'éthyle

Produit C : Rf. 0,35 (1 - 1)

20

Stade F : 2-(difluorométhyl) 2-(formylamino) 4-méthylène 6-[(méthylsulfonyl) oxy] heptanedioate de diéthyle.

On dissout 1,65 g de produit C obtenu ci-dessus dans 20 cm³ de pyridine, refroidit à 0°C et ajoute 0,725 g de chlorure de méthanesulfonyle.

On agite 30 minutes à 0°C et 5 heures à température ambiante. On verse le mélange réactionnel sur de l'acide chlorhydrique 6N glacé, extrait au chlorure de méthylène, lave la phase organique avec de l'acide chlorhydrique 6N puis avec une solution aqueuse à 10% de bicarbonate de sodium enfin à l'eau salée. On sèche et évapore à sec. On chromatographie le résidu sur silice, élue par un mélange chlorure de méthylène - acétate d'éthyle (9-1) et isole 1,55 g de produit attendu.

25

Rf. = 0,45 dans CH₂Cl₂ - AcOEt (8-2).

30

Stade G : 2-(difluorométhyl) 2-(formylamino) 4-méthylène heptane dioate de diéthyle.

On dissout 0,430 g de produit obtenu en F dans 20 cm³ de diméthoxyéthane, ajoute 2 cm³ d'eau, 0,770 g d'iodure de sodium et 0,670 g de zinc, agite et porte au reflux pendant 9 heures. On filtre, ajoute 25 cm³ d'eau au filtrat et extrait au chlorure de méthylène. On lave la phase organique à l'eau salée, sèche et évapore à sec. On obtient 300 mg de produit attendu.

35

Rf. = 0,5 dans CH₂Cl₂ - AcOEt (8-2).

Stade H : acide 2-amino 2(difluorométhyl) 4-méthylène heptane dioïque.

On dissout 250 mg de produit obtenu ci-dessus dans 5 cm³ d'éthanol, ajoute 0,5 cm³ d'acide chlorhydrique concentré, agite et chauffe au reflux pendant une heure. On neutralise avec du bicarbonate de soude et évapore à sec. On reprend dans l'eau et extrait à l'acétate d'éthyle, lave à l'eau salée, sèche et évapore à sec. On reprend le résidu dans l'éthanol, ajoute 2,5 cm³ de soude 0,1N et agite 16 heures à température ambiante. On neutralise à pH avec de l'acide acétique, amène à sec, reprend dans 2 cm³ d'eau et passe sur résine échangeuse d'ions Dowex 50 W x 8, élue à l'eau puis à l'ammoniacque 0,7N. On obtient 130 mg de produit qu'on lyophilise dans 10 cm³ d'eau. On récupère 125 mg de produit attendu.

40

Rf. = 0,6 dans BuOH - AcOH - H₂O (4-2-2).

45

Spectre RMN (ppm)

6,28 : CHF

2,56 et 2,92 : CH₂ en position 3

5,06 et 5,11 : CH₂ du méthylène substitué en position 4.

50

Exemple 13 : acide 2-(L-alanyl amino)3-heptènedioïque.

On met en suspension 1,83 g de N-[(1,1-diméthyl éthoxy) carbonyl] L-alaninate de (2,5-dioxopyrrolidin-1-yle) dans 10 cm³ de diméthyl formamide, refroidit à 0°C et ajoute goutte à goutte 0,250 g d'acide 2-amino 3-heptènedioïque dans 20 cm³ de diméthylformamide en maintenant le pH entre 8 et 9 à l'aide de triéthylamine et agite 16 heures à température ambiante. On concentre à sec, reprend par 10 cm³ d'eau, lave avec de l'acétate d'éthyle, amène à pH 1 avec de l'acide chlorhydrique 2N et extrait à l'acétate d'éthyle, sèche les phases organiques. On chromatographie le résidu sur silice, élue par un mélange : chlorure de méthylène - méthanol - acide formique (95-5-1) et isole 0,467 g de produit bloqué.

55

On reprend 0,400 g de ce dernier dans 10 cm³ d'acide trifluoroacétique dans le chlorure de méthylène (1-1) et laisse en contact pendant une heure à température ambiante. On amène à sec le milieu réactionnel, reprend le résidu deux fois par du chlorure de méthylène et amène à sec, reprend le résidu à l'eau et ajuste le pH 7 avec de la soude 2N.

60

65

On passe cette solution sur résine échangeuse d'ions Dowex 50 W x 8, élue à l'ammoniaque 0,2M et obtient 0,211 g de produit que l'on purifie sur silice éluants : éthanol - ammoniaque (9-1) puis (8-2).

On isole 108 mg de produit attendu après lyophilisation.

5 **Préparation de N-[(1,1-diméthyléthoxy) carbonyl] L-alaninate de (2,5-dioxopyrrolidin-1-yle).**

On dissout 0,2 g de B.O.C. L-alanine et 0,122 g de 1-hydroxy 2,5-dioxopyrrolidine dans 5 cm³ de diméthoxyéthane. On refroidit à 0°C et ajoute peu à peu 0,24 g de dicyclohexyl carbodiimide et laisse en contact pendant 7 heures. On filtre, amène à sec, reprend par du chlorure de méthylène, lave avec une solution aqueuse à 10% de bicarbonate de sodium, sèche et obtient 0,305 g de produit brut. On recristallise celui-ci dans 1,5 cm³ d'isopropanol et obtient 0,220 g de produit attendu. F = 164°C.

Exemple 14 : acide 2-(L-lysylamino heptanedioïque).

On dissout à température ambiante 678 mg d'acide 6-(L-lysylamino) 3-heptanedioïque préparé comme à l'exemple 9 dans 70 cm³ d'éthanol, ajoute 2,1 cm³ d'acide chlorhydrique N, puis 140 mg de palladium sur charbon actif et hydrogène sous 1100 mbars pendant 1 heure et demie. On filtre, rince à l'éthanol puis à l'eau, sèche et concentre à sec sous pression réduite.

On reprend le résidu dans l'eau, ajuste le pH à 6 à l'aide d'hydroxyde d'ammonium.

On purifie par passage sur résine échangeuse d'ions Dowex 50W x 8 en éluant à l'eau puis à l'ammoniaque 0,5 N. On évapore à sec et lyophilise. On obtient 566 mg de produit attendu.
 $\alpha_D = 29^\circ \pm 1,5^\circ$ (c = 0,7 % H₂O).

Exemple 15 : Acide 2-[N-(1-oxo octadécyl) L'alanyl gamma-D-glutamyl amino] heptanedioïque, sel de sodium.

25 **Stade A : 6-((oxo octadécyl) L-alanyl gamma-D-glutamyl O-méthyl amino) 3-heptanedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle.**

On hydrogène pendant 4 heures 450 mg de 6-[N-[(1-oxo octadécyl) L-alanyl] O-méthyl gamma-D-glutamyl] amino] 3-heptanedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle préparé comme à l'exemple 7 dans 45 cm³ de méthanol en présence de 45 mg de palladium à 10 % sur charbon actif.

On filtre, lave au méthanol et concentre à sec sous pression réduite, récupère 426 mg de produit brut que l'on dissout dans 4 cm³ de chlorure de méthylène tiède, filtre, ajoute 2 cm³ d'éther isopropylique, abandonne 16 heures à +4°C, essore et sèche sous pression réduite. On obtient 375 mg de produit attendu. F \approx 100°C.
 $\alpha_D = -16^\circ \pm 1^\circ$ (c = 0,9 % CH₂Cl₂)

35 **Spectre RMN (CDCl₃) ppm**
 CH₃ de la chaîne : 0,88
 (CH₂)_n et CO₂CH-C H₃ : 1,26
 CH₃-CH : 1,39
 40 les CO₂-CH₃ : 3,66 et 3,73
 CO₂-CH₂-CH₃ : 4,20
 NH-CH-C = O : 4,35 à 4,60

45 NH-CO { 6,25
 6,56 7,12
 7,38 7,54

50

Stade B : Acide 2-[N-(1-oxo octadécyl) L-alanyl gamma-D-glutamyl amino] heptanedioïque, sel de sodium.

55 Dans une solution de 140 mg de produit préparé au stade A dans 2,8 cm³ d'éthanol, on ajoute goutte à goutte 0,66 cm³ de soude N et maintient sous agitation pendant 16 heures à température ambiante. On évapore à sec sous pression réduite, reprend le résidu dans l'eau et lyophilise. On obtient 136 mg de produit attendu.

$\alpha_D = -21^\circ \pm 1^\circ$ (c = 0,5 % H₂O)

60 **Spectre RMN (D₂O) ppm**
 CH₃ de la chaîne 0,90
 (CH₂)_n et CH₂ en alpha de CO₂Na : 1,29
 CH₃-CH : 1,39
 65

$\begin{array}{c} \text{NaO}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \text{ en } \beta \text{ du } \text{C} \text{ de la chaîne} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	1,5 à 1,8	5
$\begin{array}{c} \text{NaO}_2\text{C}-\text{CH}_2 \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	1,9 à 2,4	10
$\begin{array}{c} \text{C}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$		15
$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3-\text{CH} \\ \diagdown \\ \text{C=O} \end{array}$: 4,33	20
$\text{Les autres } \text{N}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$: 4,10 et 4,20	25

Exemple 16 : Acide 6-[(4-hydroxy 1,4-dioxobutyl) amino] 3-heptènedioïque

Stade A : 6-[(1,4-dioxo 4-éthoxybutyl) amino] 3-heptènedioate de (7) éthyle et de (1) méthyle

On ajoute à température ambiante 338 mg de triéthylamine à 583 mg de 6-amino 3-heptènedioate de 1-méthyle 7-éthyle préparé comme à l'exemple 5D en solution dans 50 cm³ de chlorure de méthylène, refroidit à +5°C et ajoute 483 mg de 4-chloro 4-oxo butanoate d'éthyle.

On agite 1 heure à température ambiante, ajoute 25 cm³ d'eau et 1 cm³ d'acide chlorhydrique 2N et extrait au chlorure de méthylène, on lava à l'eau salée puis avec une solution de bicarbonate de sodium, sèche et évapore les solvants. On chromatographie le résidu sur silice éluant cyclohexane -acétate d'éthyle (1-1). On obtient 750 mg de produit attendu.

Spectre RMN CDCl₃ (250 Mhz) ppm

H des éthyléniques : 5,43 - 5,64

H de H₃CO₂C : 3,69

H de CH₂-CH=CH : 3,06

H des CO₂Et : 1,26 et 1,28 - 4,10 à 4,25

H des CH₂ : 2,4 à 2,7

Stade B : Acide 6-[(4-hydroxy 1,4-dioxobutyl) amino] 3-heptènedioïque

On ajoute 4,66 cm³ d'une solution N d'hydroxyde de sodium à 500 mg de produit préparé au stade A en solution dans 10 cm³ d'éthanol et agite 16 heures à température ambiante.

On traite par la résine Amberlyst 15 jusqu'à pH : 6, filtre et concentre à sec. On reprend le résidu dans 30 cm³ d'eau, filtre et lyophilise. On obtient 470 mg de produit attendu.

Spectre RMN D₂O (250 MHz) ppm

H des éthyléniques : 5,50 et 5,65

H des -CH-NH : 4,23

H de HO₂C-CH₂ : 3,02

H de CH₂-CH-CH₂ : 2,35 à 2,6

Exemple 17 : Acide 6-[N-(1-oxo octadécyl) gamma-D-glutamyl] amino] 3-heptènedioïque (sel de sodium)

Stade A : 6-[N-(1-oxo octadécyl) gamma-D-glutamyl] amino] 3-heptènedioate d'éthyle

On refroidit à 14°C, 1,28 g d'acide 4-[N-1-oxo octadécyl] glutamique en solution dans un mélange d'oxanne/tétrahydrofurane (3-1) puis ajoute en 5 minutes 0,86 cm³ de triéthylamine puis 0,43 cm³ de chloroformiate d'isobutyle. On agite pendant 35 minutes à 14°C, ajoute 647,8 mg du 6-amino 3-heptènedioate

de 1-méthyle 7-éthyle préparé comme à l'exemple 5D en solution dans 15 cm³ de tétrahydrofurane, agite 2 heures à température ambiante, chromatographie sur silice (éluant chlorure de méthylène-méthanol 98-2) et obtient 980 mg de produit brut que l'on dissout dans 3 cm³ de chlorure de méthylène, ajoute 1 cm³ d'éther isopropylique, laisse cristalliser 16 heures à +5°C, essore et sèche sous pression réduite à température ambiante.

On obtient 840 mg de produit attendu.
 $\alpha_D = +8 \pm 1^\circ$ (c = 1 % pyridine)

Spectre RMN (CDCl₃) (250 MHz) ppm

- 10 CH₃-(CH₂)_n : 0,88
 (CH₂)_n et CH₃ de OEt : \approx 1,25
 CH₂-C= et CH₂C=O : 2,1 à 2,6
 les OMe : 3,68 et 3,74
 CH₂ de CO₂Et : 4,20
 15 N-CH-C=O : 4,62
 éthyléniques : 5,45 - 5,65
 les NH- $\begin{array}{c} \text{C} \\ | \\ \text{O} \end{array}$
 : 6,56

- 20 Stade B : Acide 6-[[N-(1-oxo octadécyl) gamma-D-glutamyl] amino] 3-heptènedioïque (sel de sodium)
 On ajoute à 0°C, 2,1 cm³ de soude N à 400 mg du produit obtenu au stade A en suspension dans 10 cm³ d'éthanol. On agite 16 heures à température ambiante, concentre sous pression réduite, reprend le résidu dans 10 cm³ d'eau, filtre et lyophilise. On obtient 370 mg de produit attendu.

- 25 $\alpha_D = -13^\circ \pm 1^\circ$ (c = 1 % H₂O)

Spectre RMN (D₂O 300 MHz) ppm

- CH-CH₂-CONa : 2,93
 les CH éthyléniques : 5,43 - 5,67
 30 les CH₂ : 1,8 - 2,6
 CH-NH : 4,18
 CH₃ : 0,86

Exemple 18 : Acide 6-[(gamma-D-glutamyl) amino] 3-heptènedioïque

- 35 Stade A : 6-[(N-trifluoroacétyl gamma-D-glutamyl) amino] 3-heptènedioate d'éthyle.
 On ajoute en 15 minutes 554 mg d'acide glutamique en solution dans 30 cm³ de diméthoxyéthane dans 422 mg du produit obtenu comme au stade D de l'exemple 5. On refroidit la solution à 0°C, ajoute en 10 minutes

- 40 475 mg de dicyclohexylcarbodiimide en solution dans 10 cm³ de diméthoxy éthane et agite la suspension obtenue 16 heures à 0°C puis 4 heures à température ambiante. On filtre et évapore à sec. On reprend le résidu huileux dans 10 cm³ d'éther, filtre et évapore à sec. On récupère 1,03 g de produit brut que l'on purifie par chromatographie sur silice (éluant cyclohexane - acétate d'éthyle 5-5). On obtient 410 mg de produit attendu.

- 45 Spectre RMN (CDCl₃) 250 MHz

CO₂Et : 1,29(t) - 4,21 (p)
 CH₂ = : 2 à 2,66
 CH-CO₂CH₃ : 3,06 (d)
 CO₂-CH₃ : 3,69 - 3,77 et 3,78

- 50 $\begin{array}{c} \text{NH} \\ | \\ \text{CH} \\ | \\ \text{CO}_2 \end{array}$: 4,54 (m) 4,63 (m)

- 55
 60 CH=CH : 5,42 (m) 5,63 (m)
 NH- $\begin{array}{c} \text{C} \\ | \\ \text{O} \end{array}$
 : 6,40 (d) 8,54

65

Stade B : Acide 6-[(gamma-D-glutamyl) amino] 3-heptènedioïque

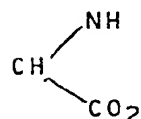
On dissout 454 mg de produit préparé comme au stade A dans 20 cm³ d'éthanol, refroidit à 0°C et ajoute 3,6 cm³ de soude N. On agite, ajoute 1 cm³ d'eau et maintient 16 heures sous agitation à température ambiante. On concentre sous pression réduite, reprend le résidu dans 2 cm³ d'eau et amène à pH 6 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 2N. On purifie par passage sur résine Dowex (50 W x 8) en éluant à l'eau puis à l'ammoniaque. On obtient 272 mg de produit que l'on dissout dans 10 cm³ puis lyophilise. On recueille 215 mg de produit attendu.

$\alpha_{D20} = -18^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (c = 0,5 % HCl₆N)

Spectre RMN (D₂O) 300 MHz ppm

CH₂-CO₂H : 2,95 (d, gamma = 7H₂)

CH=CH : 5,64 (d, J=15,5 et 7H₂) 5,49



: 3,77 (t) 4,20 (dd)

CH₂ = 2,1 à 2,7

Exemple 19 :

On a préparé des comprimés répondant à la formule :

Produit de l'exemple 6 50mg

Excipient q.s. pour un comprimé terminé à 250 mg.

(Détail de l'excipient : lactose, amidon, talc, stéarate de magnésium).

Exemple 20 :

On a préparé des comprimés répondant à la formule :

Produit de l'exemple 2

Excipient q.s pour un comprimé terminé à 250 mg

(Détail de l'excipient : lactose, amidon, talc, stéarate de magnésium).

ETUDE PHARMACOLOGIQUE**Stimulation des cellules monocytaires par un immunostimulant.**

Les cellules mononuclées du sang circulant de donneurs normaux sont séparées suivant la technique classique décrite par Boyum utilisant un gradient de Ficoll. Après lavage, les mononucléaires sont mis à incuber à 37°C pendant une heure à raison de 5.10⁶ monocytes (cellules NSE⁺) par ml de milieu de culture, 5 ml par flacon de culture. Le milieu de culture utilisé dans cette expérience se compose de RPMI 1640 additionné d'antibiotiques et de tampon Hépès. Au bout d'une heure, les cellules non adhérentes sont enlevées par lavage des flacons à l'aide de milieu précédemment porté à 37°C, les cellules adhérentes se composant essentiellement de monocytes (> 90%) sont remises en culture dans du milieu RPMI complet sans sérum en présence de différentes quantités de produits à tester précédemment mis en solution dans un tampon (Dulbecco) sans Ca²⁺ ni Mg²⁺. La culture est poursuivie pendant 24 ou 48 heures et les surnageants des cellules sont alors prélevés, centrifugés, aliquotés et conservés soit à -80°C soit à -20°C. Le surnageants de culture sont remplacés, dans les flacons par la même quantité d'eau distillée apyrogène afin de lyser les cellules. Le lysat est récupéré, aliquoté et conservé également à -20°C. Les expériences suivantes ont été réalisées en présence ou en l'absence d'Interferon gamma (10³ U/ml) à une dose où l'IFN gamma seul est inactif.

Tests de la présence dans les surnageants de monokines (Interleukine-1 et Tumor Necrosis Factor) par leur activité biologique.**Test Interleukine-1 (IL-1) :**

Ce test a été décrit la première fois par I. Gery et Waksman en 1972 (Gery I and B.H. Waksman 1972. Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator (s) J.Exp.Med., 136-143.

Il est basé sur l'action co-mitogène de l'IL-1 en présence d'un antigène (mimé par la phytohématagglutinine dans le test) sur des thymocytes de souris. 1,5 x 10⁶ thymocytes de souris C3H/HeJ (provenant du C.S.E.A.L. d'Orléans) sont mis en culture pendant trois jours en présence de différentes dilutions de surnageants et de lysats cellulaires susceptibles de contenir de l'activité IL-1 et de PHA-P Wellcome (1 µg/ml) dans des plaques

de culture 96 puits fond plat, dans un volume final de 200 µl de milieu composé de RPMI 1640 contenant outre des antibiotiques (pénicilline 1 U/ml - streptomycine 1000 U/ml du tampon Hépès 1 mM de la glutamine, 2mM 5% de sérum de veau et du 2-mercaptoéthanol 5×10^{-5} M. Au bout de 68 heures de culture, 1 µCi de thymidine tritiée est ajoutée à chaque puits (3 H-méthyl-thymidine, CEA Saclay, TMM79A activité spécifique 1 Ci/mM = 37GB1/mM), la radioactivité incorporée par les cellules est évaluée après avoir filtré les cultures sur

5

Test Tumor Necrosis Factor (TNF) :

L'activité TNF est mise en évidence par la toxicité de ce facteur sur des cellules cibles L-929 (sous-clone alpha). La technique a été sensibilisée en ajoutant dans le test de l'actinomycine D.

15

Les cellules L sont distribuées à raison de 2×10^4 cellules par puits d'une microplaque à fond plat dans 100 µl de milieu RPMI 1640 enrichi avec 5% de sérum de veau, de la glutamine, du tampon Hépès et des antibiotiques. Au bout de 24 heures, différentes dilutions des surnageants à tester sont ajoutés dans un volume de 100 µl ainsi qu'une dose d'actinomycine D de 1 µg/ml. Au bout de 24 heures de culture, la quantité de cellules non lysées est évaluée en colorant les plaques au violet crystal et en mesurant la densité optique des différents puits sur lecteur multiscan.

20

RESULTATS :

Le produit de l'exemple 9 stimule les monocytes et leur production d'IL-1 et de TNF. De plus, il y a synergie entre les produits et l'Interféron gamma.

25

B. Activité antibactérienne (in vitro)

L'activité antibactérienne des produits revendiqués a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu de Davis Mingioli additionné de 1% d'agar. Les géloses utilisées sont coulées en boîtes de Petri à 48°C, après ensemencement à 5×10^{-5} germes/ml au moyen de la souche bactérienne test. Les inocula proviennent d'une pré-culture de 24 heures en bouillon de Davis Mingioli. Après durcissement des géloses, les solutions aqueuses des produits étudiés sont introduites dans des puits (9 mm) creusés dans le milieu à l'aide d'un emporte-pièce. Les zones d'inhibition observées (diamètre en mm) sont mesurées après incubation de 24 heures à 37°C.

35

40

45

	Produit de l'exemple 6 (25 mg/l)	Produit de l'exemple 13 (25 mg/l)
Escherichia Coli 078		17,5
Salmonella typhimurium MZ11	24	20
Enterobacter cloacae 1321E	10	
Providencia sp. DU48		22

50

C. Activité antibactérienne (in vivo)

Des souris Swiss femelles pesant de 18 à 20 g (Charles River Cobs non consanguines CD1) ont été utilisées pour cette expérimentation. Chaque lot est composé de 20 animaux. Les différents produits sont mis en solution dans du sérum physiologique apyrogène de façon à obtenir des concentrations de 1 - 10 - 100 mcg/souris soit : 50 - 500 - 5000 mcg/kg.

55

Préparation de la suspension infectante (souche IP 52 145)

A) Conservation et entretien de la souche

La souche lyophilisée est réhydratée par quelques gouttes de bouillon trypticase soja (BioMérieux). Un tube de 10 ml de bouillon trypticase soja est ensemencé avec la suspension obtenue et cultivé 18 heures à l'étuve à 37°C.

60

Des tubes de gélose de conservation (Pasteur) sont ensemencés avec cette culture par piqure centrale. Après 18 heures de culture à l'étuve à 37°C, les tubes sont conservés à 22°C.

65

B) Mise en culture

Un tube de bouillon tryptic soja est ensemencé à partir d'une gélose de conservation et mis à cultiver 18 heures à l'étuve à 37°C. Des géloses inclinées tryptic soja sont ensemencées à partir de cette culture. Après 18 heures d'étuve à 37°C les germes sont récupérés à la surface de la gélose et mis en suspension dans du sérum physiologique à raison d'une anse de platine pour 10 ml d'eau physiologique. La concentration en germes est évaluée par comptage au Coulter Counter. La suspension bactérienne est diluée jusqu'à l'obtention de la dose de germes désirée puis injectée par voie I.V. sous un volume de 0,2 ml/souris. La quantité de germes revivifiables injectés est contrôlée par étalement sur boîtes de Petri contenant de la gélose trypticase.

Protocole.

L'administration a été faite par une injection par voie intramusculaire sous un volume de 0,05 ml/souris 24 heures avant l'infection.

Les germes sont injectés par voie intraveineuse sous un volume de 0,2 ml/souris. Les animaux sont observés pendant 21 jours. Une comparaison de la mortalité des animaux non traités (témoin) est effectuée par rapport à celle des animaux traités par les différents produits.

Les résultats sont exprimés soit en survie (nombre d'animaux survivants dans chaque groupe au terme des 21 jours d'observation). Le test de Fisher est utilisé en comparant les survies des groupes traités au groupe témoin. Dans le cas où on ne peut détecter une augmentation nette de la survie après 21 jours d'observation, on peut calculer pour chacun des groupes un temps moyen de survie (TMS). Dans ce cas, l'analyse statistique est faite par le test de Mann and Whitney en comparant chacun des groupes traités au groupe témoin. L'étude a été faite sur ordinateur IBM PC et logiciel Tadpole. Une protection particulièrement significative est observée dans le groupe traité par le produit de l'exemple 8 à la dose de 5 mg/kg : résultats exprimés en TMS ou en survie au terme des 21 jours d'observation.

D. ACTIVITE SUR LES MONOCYTES HUMAINS

Les produits des exemples 5 et 9 ont montré une action directe sur les monocytes humains, action mesurée par la production d'une activité TNF et d'une activité IL-1 dans les surnageants de culture (avec 5 g de produit).

De plus, avec le produit de l'exemple 9, en présence de CHU-IFN-g, on a pu mettre en évidence un effet au moins additif dans la production de monokines (TNF et IL-1).

Revendications

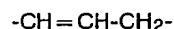
1) les composés de formule (I) :



dans laquelle U représente un radical $\text{CH}=\underset{\text{a}}{\text{CH}}=\text{CH}-$

dans lequel les traits pointillés représentent une seule double liaison éventuelle de configuration cis ou trans et a représente un atome d'hydrogène, un radical méthyle ou un groupement méthylène $-\text{CH}_2-$, Y représente un atome d'hydrogène ou le reste d'un acide aminé lié par le carboxyle alpha ou oméga ou d'un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont l'amine est éventuellement acylée par un acide aliphatique saturé ou insaturé renfermant de 6 à 24 atomes de carbone ou alkylée par un radical alkyle renfermant de 1 à 8 atomes de carbone et R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, à la condition que si Y représente un atome d'hydrogène, un radical alanine et proline et si a représente un atome d'hydrogène, U renferme une double liaison ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

2) Les composés de formule I tels que définis à la revendication 1 dans lesquels U représente un radical :



ou un radical $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$

ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

5 3) Les composés de formule (I) tels que définis à la revendication 1 et 2 dans lesquels Y est choisi dans le groupe des restes de l'alanine, la proline, la lysine et l'acide alpha ou gamma glutamique ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

4) Les composés de formule (I) tels que définis à la revendication 3 dans lesquels Y représente le reste de l'alanine ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

5) Les composés de formule (I) tels que définis à la revendication 3 dans lesquels Y représente le reste de la lysine ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

6) Les composés de formule (I) tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lesquels R représente un atome d'hydrogène ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

20 7) Les composés de formule (I) tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lesquels R représente un radical méthyle ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

8) Les composés de formule (I) tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lesquels R représente un radical CHF_2 ou encore éthyne ou vinyle ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

9) Les composés de formule (I) tels que définis à la revendication 1 dont le nom suit :

9) Les composés de formule (I) tels que définis à la revendication 1 dont le nom suit :
l'acide 6-(L-lysylamino) 3-hepténoïque ainsi que ses esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les bases.

10) Les composés de formule (I) tels que définis à la revendication 1 dont les noms suivent :

- l'acide 6-[L-alanyl-amino] 3-heptènedioïque,

- l'acide 2-[L-alanylaminio] 3-heptènedioïque,

- l'acide 2-[N-(1-oxo octadécyl) L-alanyl gamma-D-glutamylamino] heptanedioïque,

- l'acide 6-[(4-hydroxy 1,4-dioxobutyl) amino] 3-heptènedioïque,

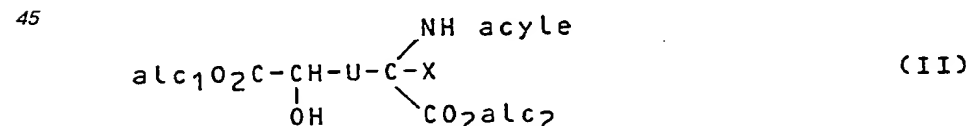
ainsi que leurs esters avec les alcools, renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les bases.

11) A titre de médicaments, les composés de formule (I) tels que définis à l'une quelconques des revendications 1 à 8.

12) A titre de médicaments, les composés de formule (I) tels que définis à la revendication 9 ou 10.

13) Les compositions pharmaceutiques renfermant comme principe actif au moins l'un des médicaments définis aux revendications 11 et 12.

14) Procédé de préparation des produits de formule (I) tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'on soumet un composé de formule (II) :



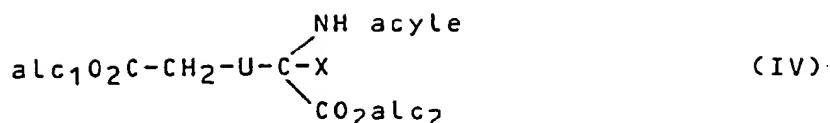
50

55 dans laquelle U conserve sa signification précédente, alc₁ et alc₂, identiques ou différents, représentent un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, X représente soit le radical R soit un groupement -CO₂alc₃ dans lequel alc₃ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone et acyle représente le reste d'un acide organique renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, à l'action d'un halocénure d'alcanesulfonyle ou d'arènesulfonyle de formule (III) :

$$\text{HAlSO}_2\text{alc}_4 \quad (\text{III})$$

60 dans lequel alc₄ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone ou un radical aryle renfermant jusqu'à 14 atomes de carbone, puis à l'action d'un agent de réduction pour obtenir le composé de formule (IV) :

65



5

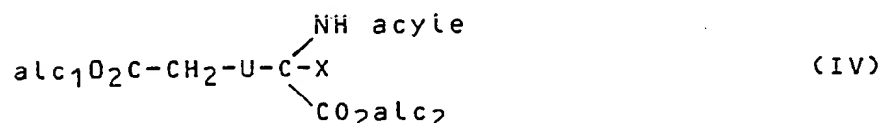
que l'on soumet, si désiré, à la totalité ou à une partie seulement des opérations suivantes dans un ordre quelconque :

10

- a) déprotection de la fonction amine,
 - b) hydrolyse des fonctions esters, puis le cas échéant décarboxylation lorsque X représente un radical $-\text{CO}_2\text{alc}_3$,
 - c) réduction de la double liaison,
 - d) estérification ou salification par une base des fonctions carboxy,
 - e) salification des fonctions amino par un acide,
 - f) amidification des fonctions aminées libres par un acide aminé ou un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont la fonction aminée est protégée puis déprotection de cette fonction aminée.
- 15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'on effectue sur le dérivé de formule :

15

20



25

dans laquelle alc_1 , alc_2 , acyle et X sont définis comme dans la revendication 14, les opérations suivantes et dans cet ordre :

30

- a) déprotection de la fonction aminée,
 - b) hydrolyse des fonctions esters,
- pour obtenir le composé de formule (IA) :

35



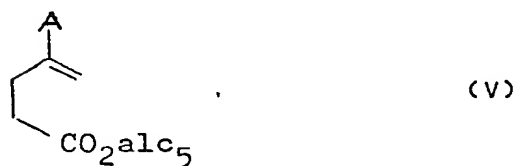
40

dans laquelle X' représente soit le radical R soit un groupement $-\text{CO}_2\text{H}$, produit IA que, si désiré, on l'amidifie par un acide aminé ou un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont la fonction aminée est protégée, puis soumet le cas échéant à un réactif de décarboxylation la fonction X' , puis déprotège la fonction amino du produit obtenu que l'on réduit, si désiré.

45

16) Variante du procédé de la revendication 14, caractérisée en ce que l'on soumet le composé de formule :

50



55

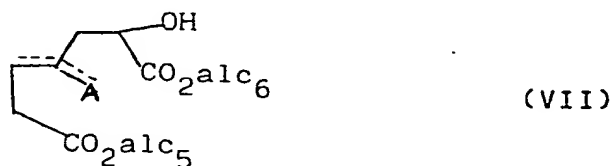
dans laquelle alc_5 représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone et A représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle, à l'action d'un composé de formule (VI) :

60



65

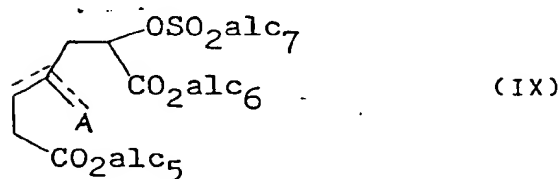
dans laquelle alc₆ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, pour obtenir le composé de formule (VII) :



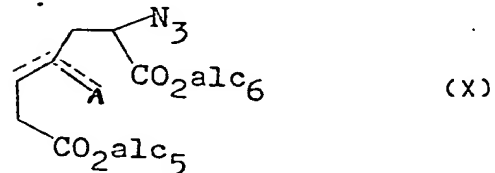
que l'on soumet à l'action d'un halogénure d'alcanesulfonyle ou d'arènesulfonyle de formule (VIII) :



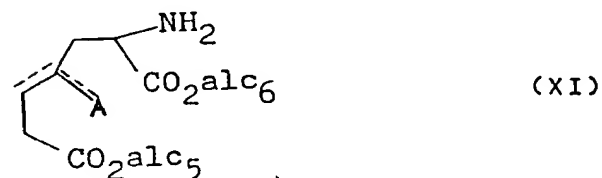
dans lequel alc₇ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 3 atomes ou un radical aryle renfermant jusqu'à 14 atomes de carbone, pour obtenir le composé de formule (IX) :



que l'on soumet, à l'action d'un azoture alcalin, pour obtenir le composé de formule (X) :



que l'on réduit et soumet le produit ainsi obtenu à une hydrolyse aqueuse, pour obtenir le composé de formule (XI) :



que l'on soumet, si désiré, à la totalité ou à seulement une partie des opérations suivantes dans un ordre quelconque :

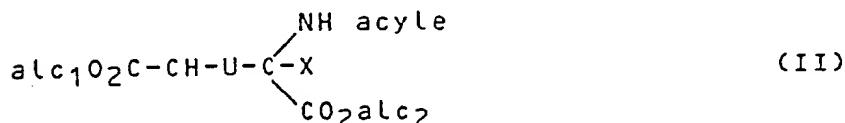
- 55
- a) hydrolyse des fonctions esters,
 - b) amidification des fonctions amino libres par un acide aminé ou un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont la fonction amino est protégée puis déprotection de cette fonction amino,
 - 60 c) réduction de la double liaison,
 - d) estérification ou salification par une base des fonctions carboxy,
 - e) salification par un acide des fonctions amino.
- 65

Revendications pour les Etats contractants suivants: ES, GR

1) Procédé de préparation des composés de formule (I) :

dans laquelle U représente un radical $\text{CH}=\underset{\text{a}}{\overset{\text{b}}{\text{CH}}}=\text{CH}-$

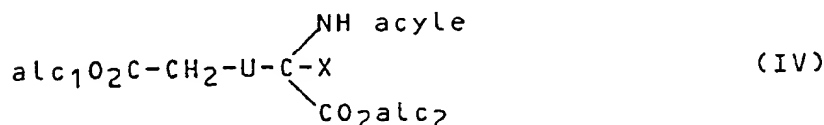
dans lequel les traits pointillés représentent une seule double liaison éventuelle de configuration cis ou trans et a représente un atome d'hydrogène, un radical méthyle ou un groupement méthylène -CH₂-, Y représente un atome d'hydrogène ou le reste d'un acide aminé lié par le carboxyle alpha ou oméga ou d'un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont l'amine est éventuellement acylée par un acide aliphatique saturé ou insaturé renfermant de 6 à 24 atomes de carbone ou alkylée par un radical alkyle renfermant de 1 à 8 atomes de carbone et R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, à la condition que si Y représente un atome d'hydrogène, un radical alanine et proline et si a représente un atome d'hydrogène, U renferme une double liaison ainsi que de leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases, caractérisé en ce que l'on soumet un composé de formule (II) :



dans laquelle U conserve sa signification précédente, alc₁ et alc₂, identiques ou différents, représentent un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, X représente soit le radical R soit un groupement -CO₂alc₃ dans lequel alc₃ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone et acyle représente le reste d'un acide organique renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, à l'action d'un halogénure d'alcanesulfonyle ou d'arènesulfonyle de formule (III) :



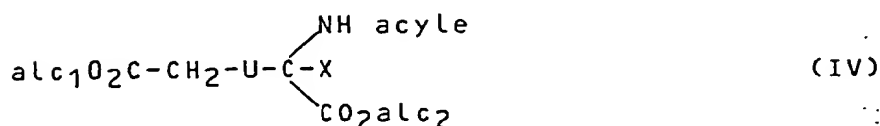
dans lequel alc₄ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone ou un radical aryle renfermant jusqu'à 14 atomes de carbone, puis à l'action d'un agent de réduction pour obtenir le composé de formule (IV) :



que l'on soumet, si désiré, à la totalité ou à une partie seulement des opérations suivantes dans un ordre quelconque :

- déprotection de la fonction amine,
- hydrolyse des fonctions esters, puis le cas échéant décarboxylation lorsque X représente un radical -CO₂alc₃,
- réduction de la double liaison,
- estérification ou salification par une base des fonctions carboxy,
- salification des fonctions amino par un acide,
- amidification des fonctions aminées libres par un acide aminé ou un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont la fonction aminée est protégée puis déprotection de cette fonction aminée.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on effectue sur le dérivé de formule :



dans laquelle alc₁, alc₂, acyle et X sont définis comme dans la revendication 14, les opérations suivantes et dans cet ordre :

a) déprotection de la fonction aminée,

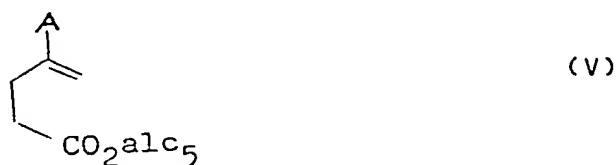
b) hydrolyse des fonctions esters,

pour obtenir le composé de formule (I_A) :



dans laquelle X' représente soit le radical R soit un groupement -CO₂H, produit I_A que, si désiré, on l'amidifie par un acide aminé ou un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont la fonction aminée est protégée, puis soumet le cas échéant à un réactif de décarboxylation la fonction X', puis déprotège la fonction amino du produit obtenu que l'on réduit, si désiré.

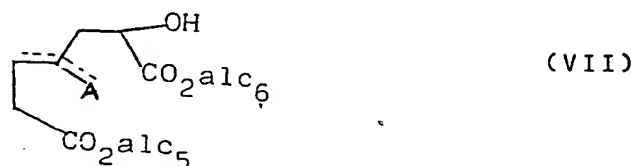
3) Variante du procédé de la revendication 1, caractérisée en ce que l'on soumet le composé de formule :



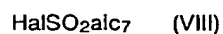
dans laquelle alc₅ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone et A représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle, à l'action d'un composé de formule (VI) :



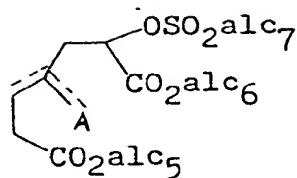
dans laquelle alc₆ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 8 atomes de carbone, pour obtenir le composé de formule (VII) :



que l'on soumet à l'action d'un halogénure d'alcanesulfonyle ou d'arènesulfonyle de formule (VIII) :



dans lequel alc₇ représente un radical alkyle renfermant jusqu'à 3 atomes ou un radical aryle renfermant jusqu'à 14 atomes de carbone, pour obtenir le composé de formule (IX) :

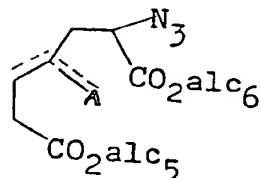


(IX)

5

que l'on soumet, à l'action d'un azoture alcalin, pour obtenir le composé de formule (X) :

10



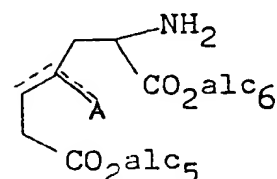
(X)

15

20

que l'on réduit et soumet le produit ainsi obtenu à une hydrolyse aqueuse, pour obtenir le composé de formule (XI) :

25



(XI)

30

35

que l'on soumet, si désiré, à la totalité ou à seulement une partie des opérations suivantes dans un ordre quelconque :

- hydrolyse des fonctions esters,
- amidification des fonctions amino libres par un acide aminé ou un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont la fonction amino est protégé puis déprotection de cette fonction amino,
- réduction de la double liaison,
- estérification ou salification par une base des fonctions carboxy,
- salification par un acide des fonctions amino.

40

4) Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'on utilise au départ un composé de formule II dans laquelle U représente un radical $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$ ou un radical $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$.

45

5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 pour préparer des produits de formule I dans laquelle Y est choisi dans le groupe des restes de l'alanine, la proline, la lysine et l'acide alpha ou gamma glutamique ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases, caractérisé en ce que l'on amidifie de façon appropriée la fonction amine libre du produit de formule XI ou celle du produit obtenu après déprotection de la fonction $-\text{NH}$ acyle du produit de formule IV.

50

6) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 pour préparer des produits de formule I dans laquelle Y représente le reste de l'alanine ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases caractérisé en ce que l'on amidifie de façon appropriée la fonction amine libre du produit de formule XI ou celle du produit obtenu après déprotection de la fonction $-\text{NH}$ acyle du produit de formule IV.

55

7) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 pour préparer des produits de formule I dans laquelle Y représente le reste de la lysine ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases caractérisé en ce que l'on amidifie de façon appropriée la fonction amine libre du produit de formule XI ou celle du produit obtenu après déprotection de la fonction $-\text{NH}$ acyle du produit de formule IV.

60

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 pour préparer des produits de formule I dans lesquels R représente un atome d'hydrogène ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes

65

de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases, caractérisé en ce que l'on utilise au départ un produit de formule II dans laquelle X représente un atome d'hydrogène ou soumet le produit de formule IV à un réactif approprié de décarboxylation.

9) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 pour préparer des produits de formule I dans lesquels R représente un radical méthyle ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases, caractérisé en ce que l'on utilise au départ un produit de formule II dans laquelle X représente un radical méthyle.

10) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 pour préparer des produits de formule I dans lesquels R représente un radical CHF₂ ou encore éthynyle ou vinyle ainsi que leurs esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases caractérisé en ce que l'on utilise au départ un produit de formule II dans laquelle X représente un radical CHF₂ ou encore éthynyl ou vinyl.

11) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on choisit le produit de départ de manière telle que l'on prépare l'acide 6-(L-lysylamino) 3-heptènedioïque ainsi que ses esters avec les alcools renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les bases.

12) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on choisit le produit de départ de manière telle que l'on prépare :

- l'acide 6-[L-alanyl amino] 3-heptènedioïque,
- l'acide 2-[L-alanyl amino] 3-heptènedioïque,
- l'acide 2-[N-(1-oxo octadécyl) L-alanyl gamma-D-glutamyl amino] heptanedioïque,
- l'acide 6-[(4-hydroxy 1,4-dioxobutyl) amino] 3-heptènedioïque,

ainsi que leurs esters avec les alcools, renfermant jusqu'à 6 atomes de carbone, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les bases.

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

Numéro de dépôt: 88402741.8

Int. Cl.⁴: **C07C 101/28 , C07K 5/06 ,
C07C 103/50 , A61K 31/16 ,
A61K 31/195**

Date de dépôt: 02.11.88

Priorité: 03.11.87 FR 8715209

Date de publication de la demande:
10.05.89 Bulletin 89/19

Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Date de publication différée du rapport de
recherche: 28.02.90 Bulletin 90/09

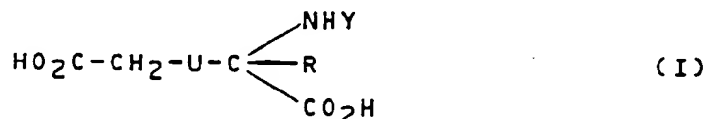
Demandeur: **ROUSSEL-UCLAF**
35, boulevard des Invalides
F-75007 Paris(FR)

Inventeur: **Agouridas, Constantin**
67, Quai d'Orsay
F-75007 Paris(FR)
Inventeur: **Fauveau, Patrick**
40, Avenue Camille Desmoulins
F-93190 Livry-Gargan(FR)
Inventeur: **Damais, Chantal**
24-26, rue du Cotentin
F-75015 Paris(FR)

Mandataire: **Tonnellier, Marie-José et al**
111, route de Noisy B.P. no 9
F-93230 Romainville(FR)

Nouveaux dérivés de l'acide aminopimélique, leur procédé de préparation et leur application comme médicaments.

L'invention a pour objet les composés de formule (I) :



dans laquelle U représente un radical $\text{CH} \cdots \text{CH} \cdots \text{CH} \cdots$ dans lequel les traits pointillés représentent une

seule double liaison éventuelle de configuration cis ou trans et a représente un atome d'hydrogène, un radical méthyle ou un groupement méthylène $-\text{CH}_2-$, Y représente un atome d'hydrogène ou le reste d'un acide aminé lié par le carboxyle alpha ou oméga ou d'un peptide constitué de 2, 3 ou 4 acides aminés dont l'amine est éventuellement acylée par un acide aliphatique ou alkylée et R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle éventuellement substitué à la condition que si Y représente un atome d'hydrogène, un radical alanine ou proline et si a représente un atome d'hydrogène, U renferme une double liaison ainsi que leurs esters avec les alcools, leurs amides primaires et secondaires et leurs sels avec les acides organiques ou minéraux ou avec les bases.

Les composés de formule (I) présentent d'intéressantes propriétés thérapeutiques qui justifient leur utilisation comme médicaments.

EP 0 315 519 A3



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 88 40 2741

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 100, no. 19, 7 mai 1984, page 299, résumé no. 153809d, Columbus, Ohio, US; N. MURAKAMI et al.: "D-2-Aminopimelic acid and trans-3,4-dehydro-D-2-aminopimelic acid from Asplenium unilaterale", & PHYTOCHEMISTRY 1983, 22(12), 2735-7 * Résumé *	1,2,6	C 07 C 101/28 C 07 K 5/06 C 07 C 103/50 A 61 K 31/16 A 61 K 31/195
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 21, 24 novembre 1975, page 295, résumé no. 175488f, Columbus, Ohio, US; S. HATANAKA et al.: "Biochemical studies on nitrogen compounds of fungi. XII. 1-2-Amino-4-methylpimelic acid, a new amino acid from Lactarius species", & PHYTOCHEMISTRY 1975, 14(7), 1559-60 * Résumé *	1	
Y	FR-A-2 566 410 (DELALANDE) * Revendications *	1,11-13	
Y	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 29, no. 1, janvier 1986, pages 89-95, American Chemical Society, Washington, DC, US; D.A. BERGES et al.: "Peptides of 2-aminopimelic acid: antibacterial agents that inhibit diaminopimelic acid biosynthesis" * Pages 90,93-94 *	1,11-13	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 25-10-1989	Examineur PAUWELS G.R.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 03.82 (P0402)



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
A	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 30, no. 6, juin 1987, pages 1074-1090, American Chemical Society, Washington, DC, US; D.W. GRAHAM et al.: "Inhibition of the mammalian beta-lactamase renal dipeptidase (dehydropeptidase-I) by (Z)-2-(acylamino)-3-substituted-propenoic acids" * Page 1084, composé 165 * ---	1	
P,X	SYNTHESIS, mars 1988, pages 173-175, Stuttgart, DE; D. PETTIG et al.: "Asymmetric synthesis via heterocyclic intermediates; XXXVII. Asymmetric synthesis of dimethyl (R)-2-amino-(E)-hept-4-enedioates by the bislactim ether method" * Page 173, product ga-b; page 175 * -----	1	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 25-10-1989	Examineur PAUWELS G. R. A.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (P0402)

THIS PAGE BLANK (USPTO)